
TRATAT DE
MICRIOBOLIOIE
GENERALA

G. ZARNEA

TRATAT de MICROBIOLOGIE GENERALĂ

****

VIROLOGIE GENERALĂ
ANATOMIE BACTERIANĂ

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
1983

Cuprins

SISTEMUL IMUNITAR

ANTIGENE ȘI ANTICORPI

SISTEMUL FAGOCITAR ȘI FAGOCITOZA

SISTEMUL LIMFOID – LIMFOCITELE T ȘI B

RĂSPUNSUL IMUN

IMUNOGENETICĂ ŞI EVOLUŢIE

HIPERSENSIBILITATEA

TEORIA REȚELEI IDIOTIPICE A SISTEMULUI IMUNITAR

VACCINURILE VIITORULUI

Prefață

Volumul al patrulea al „Tratatului de microbiologie generală" reprezintă o încercare de a prezenta conceptele fundamentale, progresele teoretice și practice ale imunologiei dintr-un punct de vedere biologic.

Lucrarea este structurată în nouă secțiuni care cuprind : 1) caracterizarea generală a sistemului imunitar ; 2) antigenele și anticorpii ; 3) fagocitoza și sistemul fagocitar ; 4) organele limfoide și limfocitele ; 5) imunogenetică și evoluție ; 6) răspunsul imun ; 7) hipersensibilitatea ; 8) rețeaua idiotipică a sistemului imunitar ; 9) vaccinurile viitorului.

Ținînd seama de contextul în care apare acest volum, vor fi abordate, în general, numai problemele corelate cu fenomenele de apărare antiinfecțioasă. În consecință nu vor fi tratate problemele de imunopatologie (imunodeficiențe, boli autoimune), imunologia transplantelor de țesuturi și organe sau ale cancerului.

Beneficiind larg de progresele realizate în alte domenii (microbiologie, virologie, biochimie, biologie celulară și moleculară, inginerie genetică etc.), precum și de progresele majore în domeniul tehnicilor de explorare (microscopie electronică, fizicochimie etc.), imunologia a înregistrat mutații profunde, devenind unul dintre domeniile cele mai dinamice ale științelor biologice. Pe plan teoretic, achizițiile din domeniul imunologiei au impus restructurări în alte domenii ale științelor biomedicale, iar pe plan practic tehnicile imunologice au fost preluate, datorită specificității și sensibilității lor deosebite, pentru determinări analitice și de diagnostic pentru o gamă largă de substanțe, de la moleculele mici ale unor medicamente la substanțe macromoleculare.

Evident că o sinteză consacrată unui domeniu care progresează atît de rapid este greu de realizat, în condițiile în care permanent se acumulează date noi ce determină o revizuire continuă a bazelor sale teoretice și o extindere a cadrului conceptual, pentru a aborda teritorii tot mai vaste. Această dinamică a fost resimțită pe întreg parcursul elaborării acestei lucrări, care a necesitat modificări și adăugiri pînă în momentul predării pentru tipar.

În aceste condiții este normal ca în multe domenii să nu existe un acord unanim, progresele complicînd adeseori înțelegerea unor mecanisme considerate anterior ca elucidate. Au fost izolate sau evidențiate foarte multe molecule noi în căutarea unor funcții, după cum multe funcții sînt în căutarea bazelor lor moleculare. O dificultate suplimentară decurge din lipsa unei terminologii unitare și mai ales din revizuirile repetate și neacceptate unanim ale markerilor fenotipici ai leucocitelor, interleukinelor și altor mediatori, anticorpilor monoclonali etc.

Prezentînd acest volum celor interesați, țin să-mi exprim recunoștința față de cercetătorii care au făcut efortul de a răspunde solicitărilor mele, oferindu-mi lucrările lor, pentru a-mi asigura o informare bogată, multilaterală și în mare măsură la zi. Bibliografia selectivă reunește numai un număr limitat din lucrările care au stat la baza concepției și a informațiilor din acest volum. Ea include, în general, pe lîngă unele lucrări originale care au marcat momente importante în evoluția acestei științe, lucrări cu caracter general ce pot servi celor interesați pentru o informare mai detaliată, precum și unele lucrări foarte recente.

Mulțumesc cu recunoștință prietenului meu, dr. Mihai Zamfirescu, de care sînt legat, printre multe altele, de amintirea marilor noștri maeștri și a școlii cantacuziniste în care ne-am format, pentru tot ce a făcut pentru mine cu devotament de-a lungul multor ani și pentru sugestiile date, prin care am beneficiat de erudiția lui. Ca și în cazul volumelor precedente, sînt profund îndatorat dr. Anca Roșeanu, care sacrificînd multe ore din timpul său liber m-a sprijinit, cu inteligență și seriozitate. În mod deosebit, sînt recunoscător colaboratoarei mele, dr. Lucia Dumitru, fără al cărei ajutor dat cu calm, competență, devotament și spirit de ordine, această lucrare nu ar fi putut apărea.

Mulțumind tuturor colegilor care și-au manifestat pe diferite căi interesul față de volumele anterioare, îmi exprim speranța că și lucrarea de față va fi utilă celor care sînt interesați de acest domeniu fascinant al biologiei moderne și de impactul său asupra științelor medicale umane și animale.

AUTORUL

Introducere

*

„În imunologie avem de-a face cu un microcosmos, care reflectă cu strălucire toate trăsăturile generale ale universului biologic”

F. M. Burnet

În comparație cu alte domenii ale științelor biologice și medicale, imunologia este o știință relativ tînără. Apărută inițial ca un domeniu particular al microbiologiei, după descoperirile lui Jenner, Pasteur și Metchnikoff, ea păstrează încă legături de importanță fundamentală cu acestea, deși, în prezent, reprezintă una dintre ramurile cele mai importante și mai dinamice ale științelor biologice.

Progresele spectaculare realizate după anii '60 au adus imunologia în prim plan, fiind, după Jerne (1983), ramura biologiei care a progresat cel mai rapid. Două cauze majore au facilitat acest proces și anume, pe de o parte, elaborarea teoriei selecției clonale a răspunsului imun și confirmarea ei experimentală, care au jalonat căile de evoluție a domeniului, iar pe de alta, dezvoltarea tehnicilor experimentale cantitative. Aprofundarea cunoștințelor referitoare la celulele și moleculele sistemului imunitar, precum și la interacțiunile dintre ele, au determinat mutații profunde la nivel conceptual și aplicativ, cu implicații teoretice și practice asupra numeroase domenii ale științelor biologice și medicale. Interesul crescînd pentru cercetarea imunologică are motivații multiple, între care amintim:

1) demonstrarea faptului că organismele superioare nu pot supraviețui în absența reacțiilor de apărare imunologică față de virusuri, microorganisme, celule și țesuturi străine, macromolecule neobișnuite etc.;

2) faptul că același sistem imunitar poate, în anumite condiții speciale, produce leziuni tisulare, uneori severe sau ireversibile, ori poate genera sau facilita apariția unor stări patologice (boli autoimune, boli prin deficit imun, alergii, respingerea transplantelor etc.);

3) posibilitatea stimulării sau a inhibării răspunsului imun într-un sens dorit, prin procedee care asigură, după caz, imunostimulare, imunosupresie sau prevenirea și tratamentul unor stări patologice;

4) utilizarea reacțiilor imunologice nu numai în domeniul propriu, ci și ca metode specifice și sensibile pentru determinări analitice și de diagnostic al macromoleculelor de tipul proteinelor serice, al enzimelor, al microorganismelor, precum și al substanțelor cu greutate moleculară mică, de tipul medicamentelor;

5) influența unor descoperiri majore din imunologie (bazele moleculare ale fenomenelor de recunoaștere, originea, diferențierea, maturarea și heterogenitatea funcțională a limfocitelor, bazele genetice ale diversității

anticorpilor, reglarea răspunsului imun etc.) asupra altor domenii ale biologiei.



Dispunînd în prezent de o bază conceptuală proprie și de un număr enorm de date categorice, legate de structura, funcția și reglarea activității constituenților săi, imunologia apare astăzi ca un domeniu bine definit al științelor biomedicale, în curs de continuă diversificare datorită acumulărilor teoretice și practice realizate în ultimele două decenii. Urmînd un ritm de evoluție rapid, din care nu lipsesc controversele și unele restructurări esențiale, ea este și promite să fie în continuare unul dintre domeniile de cercetare cele mai captivante. Revizuirea continuă a bazelor sale teoretice, expansiunea cadrului său conceptual, marile descoperiri efectuate în ultimii ani, consecințele practice și impactul asupra altor domenii explică poziția sa centrală în biologia contemporană.



Inițial, domeniul de interes cel mai important a fost cel legat de rezistența față de bolile infecțioase, fapt care explică apariția imunologiei ca știință și apartenența ei, o perioadă de timp, cadrului general al științelor microbiologice.

Denumirea domeniului vine de la cuvîntul latin *immunis*, utilizat în Roma antică pentru a desemna persoanele scutite de dări sau de alte obligații față de stat. Prin extinderea sensului, a fost ulterior folosit pentru a caracteriza persoanele, care, din diferite cauze, erau „scutite de îmbolnăvire", în cursul diferitelor epidemii.

În consecință, cadrul conceptual al imunologiei, definit în prezent sintetic ca „știința discriminării self—nonself" (J. Klein, 1980), s-a rezumat, în accepțiunea sa tradițională, la studiul reactivității organismului în cursul infecției, implicînd cunoașterea particularităților morfofuncționale ale moleculelor, celulelor și țesuturilor care condiționează existența și evoluția stării de imunitate. În acest context, imunitatea reprezenta starea de nereceptivitate sau de rezistență a unui organism față de un agent patogen, pe care îl face incapabil să genereze o infecție sau o boală. Ulterior, cadrul conceptual limitat numai la efectele benefice (și contestat de unii cercetători (Coombs și Gell, 1968)) a fost, în mod tacit, extins pentru a include și numeroasele efecte negative posibile decurgînd din stările de hipersensibilitate, respingerea transplantelor de țesuturi și organe, bolile autoimune etc.

Apariția imunologiei ca știință a fost precedată de o serie de observații empirice, referitoare la faptul că vindecarea unor boli infecțioase era urmată de o rezistență permanentă la reinfecție sau, cel mult, de evoluția unor forme ușoare de boală. Astfel, Tucidide (430 î.e.n.) cita faptul că în cursul unei mari epidemii de ciumă în Atena (după descriere, probabil, o boală diferită de cea cunoscută în prezent), unele persoane erau rezistente și îi îngrijeau pe cei bolnavi „pentru că nu erau niciodată atacați, cel puțin fatal". Deși epidemiile au apărut din primele etape ale organizării sociale a omenirii, concepțiile asupra lor nu au putut evolua atît timp cît bolile infecțioase erau considerate ca determinate de mînia zeilor, de influențe magice, de pedepse divine sau de abateri de la tabu-urile tribale.

Starea de rezistență la boală era interpretată corespunzător ca rezultatul protecției divine, al unei răsplate pentru o viață pioasă, conformă normelor statuate. Ca urmare, evoluția concepțiilor asupra originii imunității a fost condiționată de cea asupra originii bolilor infecțioase.

Perioada empirică a imunologiei este totuși marcată de unele practici, menite să mărească starea de rezistență a organismului, cum au fost cele înregistrate în China antică. Ele vizau crearea unei rezistențe față de variolă, prin inhalarea sau inocularea pe cale nazală de cruste uscate, provenite din pustule „favorabile" de la cazuri ușoare de boală. Practica variolizării interumane cu virus de variolă („Smallpox virus") nemodificat a fost introdusă în Europa (Anglia), de Lady Mary Wortley Montagu (1418), și practicată o perioadă de timp, cu toate riscurile de îmbolnăvire cu severitate necontrolată și chiar cu sfîrșit letal. A urmat introducerea în practică a vaccinării antivariolice de către Edward Jenner (1796), cu ajutorul virusului provenit de la bovine („Cowpox virus"). Metoda s-a bazat pe observația empirică a rezistenței la boală, în cursul marilor epidemii de variolă, a mulgătorilor, care anterior au fost infectați cu virusul vaccinei ce producea o infecție cu evoluție benignă.

Debutul imunologiei ca știință este greu de precizat. Într-o încercare de periodizare a evoluției sale, Jerne (1977) propune următoarele etape principale :

1) **Perioada aplicațiilor practice** este, în mod paradoxal, premergătoare stabilirii cadrului conceptual al imunologiei. Ea este dominată de Pasteur și de contemporanii săi și asociată cu unele descoperiri mari și aplicații cu importanță fundamentală.

În cursul acestei perioade au fost realizate vaccinurile atenuate contra „holerei" găinilor (1880), cărbunelui (1881) și rabiei (1885) și, fapt esențial, s-a impus ideea posibilității de a modifica virulența agenților patogeni, în sensul atenuării ei, în vederea asigurării unei protecții a organismului uman sau animal față de o serie de infecții grave. Ea a coincis totodată cu perioada care a stat la baza consolidării microbiologiei ca știință, cu repercusiuni directe, de importanță majoră asupra imunologiei.

Pasteur este primul cercetător care a încercat să explice mecanismul imunității. El pornește de la observația că cultivarea microorganismelor *in vitro* este condiționată de satisfacerea anumitor exigențe nutritive și că epuizarea nutrienților din mediu determină oprirea creșterii acestora. Extrapolînd aceste observații, Pasteur considera că în cursul unei infecții, bacteriile consumă pînă la epuizare substanțele care le sînt necesare pentru creștere, permițînd astfel vindecarea (încetarea creșterii lor), care lasă organismele imune (lipsite de nutrienți esențiali) pentru o perioadă îndelungată de timp. Ipoteza a fost abandonată chiar de Pasteur, după ce a demonstrat că ovinele „rezistente" la antrax devin sensibile dacă sînt inoculate cu doze mari de bacterii.

2) **Perioada descriptivă** corespunde, după cronologia lui Jerne, etapei 1890–1930. Ea este marcată de descoperirea fagocitozei de către Metchnikoff (1890–1910) și de punerea bazelor teoriei imunității celulare. În același timp, Behring și Kitasato (1890) evidențiază existența anticorpilor, punînd bazele conceptului de imunitate umorală.

În această perioadă, Ehrlich (1900) formulează o teorie modernă asupra anticorpogenezei (**teoria catenelor laterale**), anticipînd descoperirea fenomenelor de recunoaştere a substanţelor self şi nonself şi a receptorilor celulari. El a evidenţiat incapacitatea organismelor animale de a produce anticorpi faţă de constituenţii propriilor lor celule („Horror autotoxicus"). În cursul perioadei descriptive, Landsteiner (1914) descrie existenţa sistemului grupelor sanguine umane ABO şi implicaţiile lui în practica transfuziilor.

3) **Perioada mecanismelor moleculare** (1930—1950) precede, în mod paradoxal, pe cea a mecanismelor celulare şi este determinată de un spectru larg de cercetări de biochimie, care au elucidat structura antigenelor şi a haptenelor, a imunoglobulinelor şi relaţia structură—funcţie la imunoglobuline. În acelaşi timp, studiile efectuate cu ajutorul antigenelor artificiale au permis elucidarea proprietăţilor substanţelor imunogene şi au demonstrat capacitatea organismelor de a produce anticorpi faţă de antigene care nu se găsesc, în mod normal, în natură.

În această perioadă, concepţiile referitoare la biosinteza anticorpilor erau bazate pe teoriile instructive, după care antigenele aveau un rol de matriţă sau de model, care, direct sau indirect, determină specificitatea anticorpilor.

4) **Perioada mecanismelor celulare** (1950—1970) este profund marcată de progresele biologiei moleculare şi de interferenţa cu alte domenii prioritare ale ştiinţelor biologice (virologia, microbiologia, biologia celulară, biofizica, biochimia, genetica etc.). În cursul acestei perioade s-a realizat identificarea rolului esenţial al limfocitelor în fenomenele imunitare şi s-a demonstrat rolul plasmocitului în sinteza şi secreţia anticorpilor. Au fost identificate limfocitele T şi B, şi au fost descifrate unele dintre funcţiile lor imunitare specifice. În sfîrşit, demonstrarea imposibilităţii proteinelor de a servi ca matriţă a determinat elaborarea teoriei selecţiei clonale asupra anticorpogenezei, care a avut un rol stimulator de importanţă fundamentală asupra evoluţiei imunologiei ca ştiinţă.

5) **Perioada sistemică**, ce a urmat anilor 1970, corespunde unei abordări integratoare, de analiză structurală a întregului sistem imunitar. În acest context, imunologia apare ca un domeniu ştiinţific profund remaniat, care după opinia lui Jerne (1977, 1985) „şi-a pierdut statutul de disciplină izolată, fiind pe cale de a fi absorbită în biologia clasică", deşi aplicaţiile medicale şi perspectivele dezvoltării lor sînt dintre cele mai importante.

În această perioadă, studiile analitice de mare fineţe sînt asociate cu abordarea globală a sistemului imunitar, integrat în organism, cu studiul interacţiunilor moleculare şi celulare complexe.

Realizările ultimei perioade sînt greu de enumerat. Ele fac, în mod deosebit, obiectul lucrării de faţă. O simplă enunţare a cîtorva dintre cele mai importante evidenţiază dimensiunile progresului realizat şi sugerează impactul lor asupra disciplinelor biomedicale fundamentale şi aplicative :

— cunoaşterea intimă a celulelor sistemului imunitar (morfologia, originea, dezvoltarea ontogenetică, habitatul, modul de viaţă (sedentar sau circulant), în sînge sau limfă, durata de viaţă etc.

— heterogenitatea fenotipică și funcțională a diferitelor tipuri de limfocite: T_H, T_C, T_S, T_A, T_{DH};

— identificarea markerilor fenotipici de suprafață;

— interacțiunile dintre diferitele tipuri de celule și subpopulații;

— bazele moleculare ale fenomenelor de recunoaștere;

— descoperirea receptorului de antigen al celulelor T și a fenomenului de recunoaștere asociată;

— mecanismul activării limfocitelor T și B;

— etapele și mecanismele răspunsului imun mediat celular și umoral și ale interacțiunilor lor cooperante;

— structura genetică a complexului major de histocompatibilitate (CMH), care funcționează ca un complex major al răspunsului imun;

— identificarea și aprofundarea rolului produșilor CMH, care acționează ca semnale ce condiționează eficiența interacțiunilor cooperante dintre celule;

— descrierea structurii chimice a antigenelor de histocompatibilitate;

— identificarea genelor răspunsului imun, care determină împărțirea organismelor în „bune" sau „rele" răspunzătoare la antigene;

— stabilirea bazelor genetice ale enormei diversități a anticorpilor, identificarea genelor V și C, precizarea mecanismelor de rearanjare genetică;

— descoperirea mecanismului sintezei și secreției anticorpilor;

— evidențierea claselor și subclaselor de Ig;

— evidențierea unor variante care permit definirea unor grupuri de Ig (alotipurile), asemănătoare grupelor sanguine sau de compatibilitate;

— demonstrarea faptului că fiecare anticorp are o caracteristică individuală — idiotipul;

— structura situsului de legare a anticorpilor la nivel molecular și explorarea lui cu tehnici de rezoluție atomică;

— realizarea tehnologiei hibridomului și producerea de anticorpi monoclonali, cu uniformitate perfectă pentru un singur antigen, cu importante aplicații în practică și în cercetarea fundamentală;

— descoperirea interleukinelor, leucotrienelor și a rolului lor;

— descifrarea principalelor mecanisme de reglare prin interacțiuni celulare și moleculare.

Pe plan teoretic, perioada actuală este dominată de concepțiile lui Niels Kaj Jerne, care a remodelat conceptele tradiționale asupra sistemului imunitar și este considerat, de mulți cercetători, drept cel mai mare imunolog al tuturor timpurilor, datorită impactului concepțiilor sale asupra imunologiei contemporane. Acceptarea teoriei rețelei sistemului imunitar, formulată de Jerne încă din anul 1974, și dezvoltarea ei

de către numeroși autori, a dus la ideea că acest sistem este reprezentat de o rețea de celule și molecule menținută, în mod normal, în echilibru dinamic. Acest echilibru este perturbat doar în cazul introducerii unui antigen, a unor idiotipuri sau antiidiotipuri (vezi cap. „Teoria rețelei idiotipice a sistemului imunitar"). Conceptul are o importanță majoră pentru explicarea reglării fiziologice a sistemului imunitar și în înțelegerea unor modificări care stau la baza unor stări patologice, cum sînt cele de autoimunitate. În același timp, el deschide calea unor aplicații practice nebănuite ca, de exemplu, cea de producere activă a unui răspuns imun protector față de un agent infecțios, prin imunizare cu un antiidiotip, în absența antigenului viral sau bacterian.

Este de așteptat ca descifrarea complexității constituenților celulari și moleculari ai sistemului imunitar, a controlului global al rețelei generate de interacțiunea lor, precum și analiza și modelarea experimentelor și teoriilor imunologice noi să deschidă, în viitorul apropiat, un orizont nou nu numai asupra domeniului propriu, ci și în cel al unor tot mai numeroase domenii ale biologiei și medicinii.

CRONOLOGIA PRINCIPALELOR CONCEPTE, DESCOPERIRI ȘI TEHNICI IMUNOLOGICE

1798 Edw. Jenner
Vaccinarea antivariolică.

1880—1885 L. Pasteur
Vaccinurile atenuate contra holerei găinilor (*Pasteurella*) (1880); v. anticărbunos (1881) și v. antirabic (1885).

1883 E. I. Metchnikoff
(Nobel, 1908)
Descoperirea fagocitozei.
Teoria imunității celulare.

1888 E. Roux, A. Yersin
Descoperirea toxinelor bacteriene.

1888 C. Richet, C. Héricourt
Rolul protector al serului de la animalele vaccinate.

1890 R. Koch
(Nobel, 1905)
Fenomenul Koch.
Imunodiagnosticul cu tuberculină.
Hipersensibilitatea de tip întîrziat.

1890 E. von Behring
(Nobel, 1901)
Bazele seroterapiei: imunitatea antitetanică și antidifterică sînt date de anticorpi (antitoxine).

1894 R. Pfeiffer, V. I. Isaeff
Bacterioliza imunitară la *Vibrio cholerae*.
Fenomenul Pfeiffer.

1896 J. Bordet
(Nobel, 1919)
Rolul complementului în bacterioliză.
Rolul factorilor umorali și al anticorpilor în apărare.

1896 I. E. Durham, M. von Gruber
Aglutinarea specifică.

1896 G. Widal, A. Sicard
Reacția de aglutinare în diagnosticul febrei tifoide.

1897 P. Ehrlich
(Nobel, 1908)
Standardizarea toxinelor și a preparatelor antitoxice.

1897 R. Kraus
Reacția de precipitare.

1898 J. Bordet
Hemoliza specifică.
Rolul anticorpilor și al complementului.

1900 P.Ehrlich
Formularea teoriei catenelor laterale pentru explicarea producerii anticorpilor.

1900 K.Landsteiner
(Nobel, 1930)
Descoperirea grupelor sanguine (sistemul ABO).

1900 J. Bordet, O. Gengou
Reacția de fixare a complementului ca metodă de diagnostic.

1902 Ch. Richet
(Nobel, 1913)

P. Portier
Descoperirea anafilaxiei.
Rolul mecanismelor imunitare în inducerea stărilor patologice.

1903 M. Arthus
Descoperirea hipersensibilității (fenomenul Arthus), cu leziuni necrotice specifice.

1903 A. E. Wright, S. R. Douglas
Descoperirea opsonizării.

1903–1907 S. Arrhenius
Bazele teoretice ale imunochimiei.

1905 C. von Pirquet
Boala serului.
Alergia ca rezultat al modificării reactivității imunologice.

1910 W. H. Schultz, H. Dale
Testul pentru anafilaxie.

1921 K. Landsteiner
Conceptul de haptenă.

1921 A. Calmette, C. Guérin
Vaccinarea BCG.

1921 C. Prausnitz, H. Küstner
Transferul pasiv al hipersensibilității față de un antigen.

1924 G. Ramon
Obținerea de toxoid prin acțiunea formolului și a căldurii asupra exotoxinelor. Vaccinarea cu anatoxină.

1930 F. Breinl, F. Haurowitz
Teoria matriței în producerea anticorpilor.

1935 A. Besredka
Imunitatea locală.
Vaccinarea orală.

1935 M. Heidelberger, F. E. Kendall
Purificarea anticorpilor.
Reacțiile cantitative de precipitare.

1937 M. Theiler
(Nobel, 1951)
Vaccinarea contra febrei galbene cu virus atenuat.

1938 P. Marrack
Teoria rețelei în producerea reacțiilor antigen—anticorp.

1938 A. Tiselius, E. Kabat
Natura gamaglobulinică a anticorpilor.

1940 K. Landsteiner, A. Wiener
Grupul Rh.

1942 A. Coons
Imunofluorescența.

1942 L. D. Felton
Toleranța imunitară față de polizaharidul de pneumococ.

1942 J. T. Freund
Rolul adjuvanților în răspunsul imun (vaccinare).

1942 K. Landsteiner, M. W. Chase
Transferul pasiv al hipersensibilității de tip întîrziat numai cu ajutorul celulelor (Imunitatea adoptivă).

1943–1944 P. B. Medawar
Stabilirea bazelor imunologice ale respingerii transplantelor de țesuturi normale străine.

1944 P. B. Medawar
(Nobel, 1960)

F. M. Burnet
(Nobel, 1960)
Descoperirea toleranței imune dobîndite.

Respingerea grefelor de țesuturi este supusă regulilor de specificitate imunologică.

1944 F. M. Burnet
Teoria selecției clonale.
Evoluția răspunsului imun.

1945 R. D. Owen
Descrierea toleranței imune la gemenii dizigoți ai taurinelor.

1946 J. Oudin
Precipitarea în gel.

1946—1948 G. D. Snell
(Nobel, 1980)
Producerea primelor linii de șoareci congenici.
Introducerea termenului de histocompatibilitate.

1948 O. Ouchterlony, S.D.Elek
Dubla difuzie (a antigenelor și a anticorpilor) în gel.

1948 A. Fagreus
Anticorpii sînt produși în plasmocite.

1949 E. A. Kabat, W. T. Morgan, W. M. Atkins
Elucidarea structurii antigenelor de grup sanguin, A,B,O.

1952 J. Riley, G. West
Prezența histaminei în granulațiile mastocitelor.

1952 O. C. Bruton
Descrierea agamaglobilinemiei umane.

1953 P. Grabar, C. A. Williams
Analiză imunoelectroforetică a anticorpilor.
Heterogenitatea Ig.

1955 N. K. Jerne
(Nobel, 1984)
Teoria selecției clonale.

1956 J. Oudin, R. Grubb
Descoperirea alotipurilor.

1957 A. Isaacs, M. Lindenmann
Descoperirea interferonilor.

1957 D. Bovet
(Nobel, 1957)
Utilizarea antihistaminicelor în terapeutica antialergică.

1958 F. M. Burnet
Dezvoltarea teoriei selecției clonale.

1958 J. Dausset
(Nobel, 1980)
Antigenele de histocompatibilitate.
Complexul major de histocompatibilitate la om.

1959 G. M. Edelman
(Nobel, 1972)
Caracterul omogen al Ig de mielom.
Secvența primară a Ig (1969).
Localizarea situsului activ și a domeniilor Ig.

1959 R. R. Porter
(Nobel, 1972)
Structura chimică a Ig.
Modelul general de structură a anticorpilor ; structura regiunilor V și C.

1959 J. Gowans
Rolul limfocitelor în imunitate.

1959 R. Yalow, S. A. Berson
Introducerea testelor radioimunologice.

1960 S. Avrameas, J. Uriel
Testele de marcare enzimatică a antigenelor și a anticorpilor.

1961 J. F. A. P. Miller, R. A. Good
Descoperirea funcției timusului.
Efectele timectomiei la naștere.

1962 G. Mackaness
Imunitatea celulară față de bacteriile parazite intracelulare.

1963 B. Benacerraf
(Nobel, 1980)
Rolul genelor Ir.
Rolul CMH în patologie.
Reglarea răspunsului imun.
Cooperarea dintre celulele T și B.

1963 N. K. Jerne, R. J. Henry, A. A. Nordin
Elaborarea tehnicii formării de plaje, pentru detectarea celulelor producătoare de anticorpi.

1964 G. Biozzi
Elaborarea testului rozetelor.

1966 K. Ishizaka, M. Ishizaka
Descoperirea IgE ca anticorp reaginic.

1969 M. Sela
Structura și funcțiile antigenelor
Polipeptidele sintetice ca antigene.

1969 J. Oudin
Descoperirea idiotipurilor.

1969 J. F. A. P. Miller, G. Mitchell
Definirea funcției timusului.
Descoperirea dihotomiei sistemului imunitar (dependent și independent de timus).

1969 N. A. Mitchison
Descoperirea cooperării celulelor T—B și a funcției T helper în producerea anticorpilor.

1971 J. C. Cerrotini, K. T. Brunner, R. Perlmann
Descoperirea celulelor T citotoxice.

1971 J. Chiller
Definirea toleranței celulelor T și B.

1972 R. K. Gershon
Descoperirea celulelor T supresoare.

1973 C. S. David, D. C. Shreffler, J. Klein
Descoperirea antigenelor Ia.

1974 N. K. Jerne
(Nobel, 1984)
Teoria rețelei idiotipice a sistemului imunitar.

1975 G. J. F. Köhler
(Nobel, 1984),
C. Milstein
(Nobel, 1984),
Tehnologia hibridomului.
Anticorpii monoclonali.

1977 R. Yallow
(Nobel, 1977)
Testele radioimunologice.

1978 S. G. Nathanson, J. Strominger
Caracterizarea structurală a antigenelor CMH.

1978—1980 S. Tonégawa
(Nobel, 1987)
Determinismul genetic al diversității anticorpilor.

1983—1985 P. Marrack, J. Kappler, J. Allison,
Stabilirea structurii receptorilor de antigen ai celulelor T.

SISTEMUL IMUNITAR

„Caracteristicile specifice și universale ale sistemului imunitar par la fel de fundamentale pentru lumea vie ca și codul genetic"

E. L. COOPER

„Discriminarea între self și nonself este inima imunologiei"

P. KOURILSKY

„Nu există nici un cod universal pentru a ști dinainte dacă un constituent este „self" sau „nonself". Această capacitate este „învățată" și deci „dobîndită" și nu înnăscută sau determinată genetic. Învățătura începe de la apariția primelor limfocite în embrion și continuă toată viața. Toate limfocitele nou formate trec prin faza de educație".

M.L. FELDMANN

1973 J. Miller

1975 G. Köhler (Nobel, 1984),

C. Milstein (Nobel, 1984),

Tehnologia hibridomului, anticorpii monoclonali.

1977 R. Yalow (Nobel, 1977)

Tehnici radioimunologice

1983 P. Marrack, J. Kappler, J. Allison

structurii receptorilor de antigen a celulelor T.

Sistemul imunitar

„Pe lingă funcţiile sale vitale, sistemul imunitar, esenţial pentru supravieţuire, este un exemplu fascinant de inventivitate biologică. Fără el, moartea consecutivă infecţiilor ar fi inevitabilă".

S. Tonegawa

În concepţia modernă (Jerne, 1973, 1985), sistemul imunitar poate fi considerat ca un organ difuz, celular şi molecular, alcătuit dintr-un număr mare de limfocite ($\sim 2 \times 10^{12}$) şi molecule de anticorpi ($\sim 10^{20}$), avînd funcţia esenţială de supraveghere a identităţii organismului. Aşa cum organismele vii selecţionate în cursul evoluţiei îşi menţin integritatea de specie, graţie sistemului lor genetic, sistemul imunitar asigură integritatea organismelor individuale faţă de agresiunea diferiţilor agenţi patogeni sau de pătrunderea unor substanţe nedorite, menţinîndu-le individualitatea şi homeostazia. El este alcătuit din ansamblul celulelor şi moleculelor, ale căror acţiune şi interacţiune permit organismului să discearnă, în mod specific, cu promptitudine şi sensibilitate, substanţele proprii *(self)* de cele străine *(nonself)*. În acest proces, sistemul imunitar acţionează ca un dispozitiv de recunoaştere ("Recognition machine" — Jerne, 1977). În mod normal, el manifestă o toleranţă perfectă faţă de constituenţii proprii şi reacţionează împotriva celor nonself, în sensul neutralizării, distrugerii şi eliminării lor din organism.

În ansamblu, sistemul imunitar este unul dintre cele mai complexe din organism. Complexitatea sa derivă din structura de reţea complicată de comunicaţii, celulară şi moleculară, din ubicuitatea constituenţilor săi, din capacitatea de a determina efecte multiple, bazate pe un număr relativ puţin numeros de tipuri diferite de celule, care interacţionează direct sau prin intermediul unor mediatori moleculari biologic activi. Celulele şi moleculele acestei reţele defensive menţin permanent supravegherea organismelor. Ele recunosc o varietate aproape fără limite de celule şi molecule străine, deosebindu-le de cele ale organismului însuşi. Cînd un agent patogen (virus, bacterie etc.) pătrunde în organism, îl detectează şi se mobilizează pentru a-l neutraliza şi/sau a-l îndepărta. Ele îşi „amintesc" fiecare infecţie şi la a doua expunere, la acelaşi agent patogen, reacţionează cu mult mai mare eficienţă. Remarcabil, după Tonegawa (1985), este faptul că sistemul imunitar face toate acestea cu un foarte mic „buget de apărare", respectiv utilizînd numai o mică parte a genomului şi, în general, a resurselor organismului.

Versatilitatea şi flexibilitatea sa intrinsecă constituie unul din avantajele majore ale complexităţii sistemului imunitar. Datele experimentale demonstrează că aproape nu există nici un moment în care organismul să fie limitat la o singură cale de răspuns faţă de o anumită

substanță străină sau un anumit agent patogen. Existența unor căi alternative sau cu rol compensator face ca atunci cînd o cale a sistemului este afectată, tranzitoriu sau permanent, organismul să poată răspunde totuși eficient față de o agresiune exogenă, minimalizînd riscurile ce decurg din deficiențele imunitare.

Conceptul de self și nonself

Termenii self și nonself au fost propuși de Burnet și Fenner (1945) cu scopul de a facilita discuțiile asupra capacităților de recunoaștere ale sistemului imunitar. Capacitatea organismelor de a deosebi substanțele proprii (engl. „self" = identic, personalitate, făcut din același material) de cele străine („nonself") a fost semnalată încă din anul 1597, de chirurgul italian Tagliocozzi. El își deconsilia contemporanii să practice grefe, datorită „caracterului particular al fiecărui individ, care se opune acestui lucru".

Inițial, conceptul de nonself se referea exclusiv la substanțele străine exogene. Ulterior, numeroase observații au evidențiat capacitatea sistemului imunitar de a răspunde prin producerea de anticorpi sau prin reacții de hipersensibilitate față de unii constituenți proprii organismului-gazdă. Acesta este cazul unor substanțe aflate, în mod normal, prin poziția lor anatomică la adăpost de contactul cu celulele sistemului imunitar (antigenele „sechestrate") sau care au suferit o serie de modificări, în special calitative, ale suprafeței celulare (self „alterat", transformare malignă etc.). Sistemul imunitar poate reacționa și față de molecule străine care, în principiu, nu sînt dăunătoare, așa cum sînt unele proteine din alimente, dacă nu sînt, în prealabil, degradate de enzime la aminoacizi.

Observațiile lui Witebsky și Rose (1956), precum și cele ale lui Weir 196 3), confirmate ulterior de numeroși cercetători, au consolidat concepția că reactivitatea față de autoantigene reflectă aceeași proprietate fundamentală a sistemului imunitar de a reacționa cu orice moleculă recunoscută ca diferită de cele proprii, normale, cu care vine în contact permanent, indiferent dacă este de origine endogenă sau exogenă.

Boyden (1966) a propus, ca mai potriviți, termenii de imunologic acceptabil și respectiv imunologic inacceptabil, însă cei de self și nonself au fost repede acceptați și sînt folosiți curent, probabil și datorită simplității lor.

Fenomenele de recunoaștere și de discriminare a self—nonself în lumea vie

Fenomenele de recunoaștere self — nonself și diferitele procese de rezistență și/sau imunitate consecutive sînt prezente, uneori în forme specifice și cu grade de complexitate diferite, practic la toate sistemele biologice.

În cazul bacteriilor, ele sînt limitate la nivel molecular și vizează păstrarea individualității și menținerea homeostaziei celulei procariote, prin protejarea structurii materialului genetic, respectiv a patrimoniului lor ereditar.

Fenomenul de restricție, descris de Luria și Human (1952), precum și de Bertani și Weigl (1953), datorat enzimelor de restricție identificate de Nathans și Smith (1975), funcționează ca o reacție de apărare foarte eficientă pentru păstrarea individualității bacteriilor, prin degradarea materialului genetic străin provenit de la exterior. Este posibil ca importanța acestui fenomen în evoluție și în menținerea originalității și integrității speciei să fie mai mare decît este estimată în prezent. Date recente pledează pentru ideea că situsurile de acțiune ale restrictazelor acționează frecvent ca zone critice ale moleculelor de ADN, cu semnificație deosebită pentru biologia bacteriilor.

În categoria fenomenelor de recunoaștere pot fi încadrate fenomenele de incompatibilitate a plasmidelor (rezistența la reinfecție cu o plasmidă omologă celei prezente anterior în celula bacteriană).

„Imunitatea" bacteriilor lizogene față de reinfecția cu un fag temperat omolog, precum și mecanismele complexe de reparare a materialului genetic lezat, cu grade diferite de fidelitate, reprezintă în acest cadru conceptual larg fenomene care vizează homeostazia și respectiv menținerea individualității celulare.

Un mecanism particular, imunitatea la transpoziție („Transposition immunity") a fost descris de Heffron (1983). El este caracteristic unor anumiți transpozoni (Tn^3, Tn^{501} etc.) *, care se pot insera într-un număr mare de situsuri-țintă pe o moleculă de ADN. După ce o copie a unui astfel de element genetic este inserată într-un anumit situs, el face toate celelalte situsuri indisponibile pentru legarea unui al doilea element omolog sau înrudit, chiar dacă sînt situate la zeci de mii de perechi de baze distanță de situsul primei inserții. Fenomenul nu determină o blocare generală a transpozițiilor într-o anumită celulă, deoarece situsurile diferite rămîn ținte bune pentru transpoziție și fenomenele de recombinare replicativă intramoleculară continuă să aibă loc în mod normal. Exemplul citat reprezintă un caz în care un element genetic (Tn) poate acționa la distanță, de-a lungul unei molecule de ADN, pentru a împiedica recombinarea acestuia cu o secvență din exterior (Shapiro, 1985).

Plantele superioare. În absența, cel puțin aparentă, a unor mecanisme de recunoaștere specifică, plantele superioare dispun de o gamă largă de modalități de apărare, evidente mai ales în relațiile lor cu diferiții agenți patogeni infecțioși. Încă din anul 1936, T. Săvulescu, într-o încercare de sinteză privind patogeneza comparată a bolilor plantelor și animalelor dintr-un punct de vedere unitar, considera că „imunitatea plantelor față de bacterii sau alți agenți infecțioși este un fapt indiscutabil, definitiv cîștigat pentru biologie". El cita printre factorii protectori potențiali, activi la diferitele specii studiate pînă la acea dată:

1) Continuitatea și integritatea țesuturilor tegumentare acoperite cu substanțe greu permeabile, care se opun pasiv pătrunderii bacteriilor și altor microorganisme;

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 120.

2) Rezistența fiziologică prin componentele sale care includ: a) rezistența chimică determinată de conținutul mare în unele zaharurire ducătoare; b) prezența taninurilor, antocianilor, flavonelor, diferiților acizi organici (citric, tartric, malic etc.); c) pseudoanticorpii, substanțe preformate, prezente în sucurile vegetale, capabile să producă fenomene în aparență analoge celor determinate de anticorpi, ca, de exemplu, aglutinarea hematiilor (pseudohemaglutinine), a bacteriilor (pseudobacterioaglutinine), efecte antihemolitice (pseudoantihemolizine) sau precipitante (pseudoprecipitine); d) fenomenele de digestie intracelulară; e) substanțele antimicrobiene, descrise ulterior, sub denumirea de fitoncide sau biocide vegetale.

Menționa, de asemenea, unele observații de tipul imunității la suprainfecție și la reinfecție, precum și unele date preliminare privind imunitatea „postvaccinală".

Cercetările ulterioare au extins gama mecanismelor protectoare față de agenții patogeni, prin evidențierea rolului următorilor factori:

1) Formarea de bariere mecanice prin impregnarea pereților celulari cu suberină sau lignină, rezistente la degradarea de către microorganisme,

2) Inactivarea toxinelor sau a enzimelor microbiene care pot leza sau omorî celulele vegetale,

3) Sinteza normală sau consecutivă infecției a unor substanțe toxice pentru agenții patogeni. Un rol important revine fitoalexinelor, care, după cum a demonstrat Perrin (1964), în cazul faseolinei („Phaseolin"), se acumulează în concentrații antifungice pe măsură ce celulele plantei reacționează hipersensibil față de patogeni. Fitoalexinele formează o gamă largă de compuși antimicrobieni, cu structură chimică diferită, produși de plante, ca răspuns la leziunile celulare induse de agenții patogeni. Ele declanșează reacții de hipersensibilitate asociate cu moartea rapidă a celulelor-gazdă, limitînd foarte mult creșterea agenților patogeni (Deverall, 1972).

4) Un factor limitant important este reprezentat de lipsa din planta-gazdă sau indisponibilitatea substanțelor necesare pentru a asigura creșterea continuă a agenților patogeni, concentrația inadecvată sau proporția defavorabilă a unor nutrienți esențiali.

În regnul animal, discriminarea self — nonself are o importanță fundamentală în apărare și poate fi considerată, în același timp, ca o precondiție pentru evoluția unei organizări animale complexe. Prezentă într-o formă rudimentară la protozoare, ea asigură recunoașterea și selecția hranei, identificarea partenerilor compatibili pentru conjugare, iar la organismele parazite recunoașterea celulelor-gazdă.

Capacitatea de recunoaștere specifică a fost evidențiată la protozoare (*Amoeba*, *Paramoecium*, *Stentor*), la care schimbul de nuclei între două celule este echivalent unei grefe. Experimental s-a demonstrat că reușita depinde de compatibilitate: 1) celula receptoare moare dacă nucleii provin de la surse îndepărtate genetic; 2) dacă nucleii sînt reimplantați într-o celulă receptoare identică sau foarte înrudită cu cea donatoare, grefa prinde și celula receptoare supraviețuiește. Aceste reacții anticipează fenomenele complexe de histocompatibilitate, care la om și la mami-

fere, în general, determină respingerea grefelor alogene de țesuturi și organe.

Spongierii ocupă, după Cooper (1982), o poziție crucială, deoarece reprezintă primul grup de animale multicelulare care prezintă caracteristicile ancestrale ale imunocompetenței și capacitatea de a deosebi eficient componenții self de cei nonself. La animalele multicelulare coloniale, de tipul spongierilor și coralilor, la care contactul interspecific este frecvent în cursul creșterii, recunoașterea self — nonself are un rol esențial în minimalizarea efectelor contactului între organisme înrudite, dar străine (alogenice). Capacitatea de a induce reacții citotoxice distructive și de a răspunde mai intens la contactele repetate, datorită unei memorii de scurtă durată, împiedică încrucișările incompatibile în cadrul coloniilor.

La organismele superioare, coexistența cu microorganismele în cursul evoluției a determinat apariția unor mecanisme sofisticate de rezistență și imunitate, cu ajutorul cărora pot combate agenții patogeni invadatori. Această coexistență continuă și în prezent, avînd chiar un rol pozitiv în stimularea mecanismelor de apărare individuală. Dovada o constituie faptul că animalele axenice („germ-free") au un număr de celule B și de molecule de anticorpi de 5—10 ori mai mic decît animalele convenționale. Mecanismele prezente la organismele superioare nu sînt numai rezultatul dezvoltării factorilor celulari sau umorali primitivi, disponibili pentru apărarea nevertebratelor. Evoluția a furnizat o serie de tipuri celulare mult mai specializate funcțional, cu eficiență crescîndă, care participă în diferite reacții prin care organismul neutralizează, sechestrează sau omoară și îndepărtează agenții agresori. O evoluție analogă în complexitatea și specificitatea factorilor umorali asigură neutralizarea toxinelor și a virusurilor, precum și mobilizarea eficientă și activarea mai multor tipuri de celule cu rol în apărare.

În consecință, reacțiile de rezistență și imunitate la organismele superioare au forme foarte diferite, locale și sistemice, specifice și nespecifice, umorale sau celulare. De cele mai multe ori, o serie de mecanisme acționează simultan, determinînd o redundanță imunologică ce explică menținerea stării de sănătate, uneori, chiar în prezența unui defect imunologic semnificativ.

Constituenții sistemului imunitar

În sens strict, sistemul imunitar este format din celule capabile să interacționeze specific cu antigenele, funcție îndeplinită, în principal, de cele două categorii majore de imunocite: *limfocitele T* (derivate din timus) și *limfocitele B* (independente de timus). După Jerne (1976), celulele sistemului imunitar sînt reprezentate exclusiv de limfocite sau în proporție de 98% de limfocite. Un punct de vedere mai pragmatic asociază limfocitelor, al căror rol este precumpănitor, o serie de celule „accesorii", cum sînt macrofagele și unele celule înrudite cu ele, de tipul celulelor dendritice din splină, celulele specializate din timus, celulele Langerhans din epitelii, celulele interdigitate etc. Deși nu interacționează specific cu antigenele, acestea au un rol esențial în înglobarea, concentrarea, prelu-

crarea şi „prezentarea" antigenelor, determinînd natura celulelor T ce vor fi stimulate specific, pentru a deveni celule efectoare. În plus, macrofagele secretă mediatori biologic activi, care reglează tipul şi amploarea răspunsului celulelor T şi B, fie stimulînd, fie inhibînd diviziunea şi diferenţierea lor. O serie de reacţii de tip imunitar angajează şi alte celule ca: monocitele, granulocitele (care fac imunofagocitoză), mastocitele, celulele K („Killer") şi NK („Natural Killer"), trombocitele etc. (fig. 1).

În general, celulele cu rol de apărare şi imunitate au la adult originea în măduva oaselor. Limfocitele reprezintă, în funcţie de specie, între 20 şi 80% din celulele nucleate ale sîngelui şi > 99% din cele ale limfei (Bainton, 1980). Stadiile lor mature sînt prezente în sînge, de unde pot migra în ţesuturi şi organe (splină, ganglioni limfatici, amigdale, apendice, mucoasa intestinală şi respiratorie etc.). Ele au deci capacitatea de a circula prin sînge şi limfă şi de a coloniza teritorii specifice ale unor organe specializate, avînd o arhitectură adecvată, pentru a favoriza întîlnirea lor cu antigenele şi pentru a asigura „capturarea" substanţelor nonself.

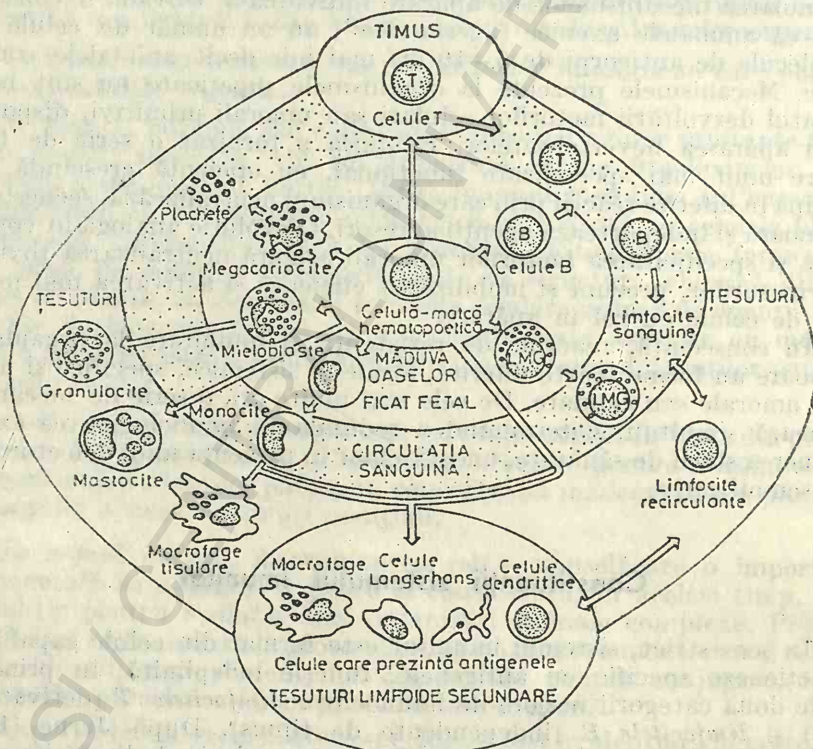


Fig. 1. — Originea celulelor sistemului imunitar. Figura prezintă raporturile lor cu organele limfoide primare şi secundare, cu circulaţia sanguină şi cu diferitele ţesuturi (după Roitt, Brostoff şi Male, 1985).

Alcătuite din subpopulaţii funcţional diferite, cu rol efector, de reglare sau de memorie, ele reprezintă componenţii celulari specifici ai sistemului imunitar. Limfocitele formează în organism o reţea complexă de celule,

capabile să reacționeze cu substanțele străine, datorită prezenței pe suprafața lor a unor receptori foarte specifici pentru un anumit tip de antigen.

Introducerea unei substanțe nonself determină o serie de interacțiuni specifice cu anumite subpopulații limfocitare, perturbînd homeostazia rețelei și declanșînd o serie de fenomene complexe ca : 1) selecția subpopulațiilor celulare care poartă receptori pentru determinanții antigenici ai substanțelor respective ; 2) amplificarea lor numerică ; 3) diferențierea și maturarea lor funcțională etc. Deoarece limfocitele fac parte dintr-o rețea de celule care interacționează armonios, asigurînd homeostazia organismului, pătrunderea unei substanțe nonself perturbă întregul sistem de interacțiuni. Ansamblul modificărilor produse pe această cale formează răspunsul imun.

Anticorpii sînt constituenții moleculari cel mai bine cunoscuți ai sistemului imunitar și, totodată, cele mai cunoscute molecule de recunoaștere studiate pînă în prezent. Din punct de vedere chimic sînt imunoglobuline, prezente într-o varietate imensă de tipuri, cu specificitate diferită. Organismul uman adult conține $\sim 10^{20}$ molecule de Ig, ceea ce corespunde la ~ 10 mg/ml sînge sau respectiv 50—100 g (Jerne, 1985). La șoarece, animalul folosit cel mai frecvent ca model experimental în imunologie, aceste valori sînt de $\sim 3\,000$ de ori mai mici. În afară de rolul lor de legare specifică a antigenelor și de funcțiile lor biologice (neutralizarea substanțelor străine, „marcarea" lor pentru a fi distruse de alte sisteme de apărare sau favorizarea înglobării agenților patogeni prin fagocitoză etc.), moleculele de Ig servesc ca receptori specifici de antigen pe suprafața celulelor B.

Conceptul de repertoriu

Sistemul imunitar dispune de un repertoriu imens de unități de recunoaștere și de legare a antigenelor, codificate genetic sub forma receptorilor celulari și a situsurilor active de combinare (paratopi) ale moleculelor de anticorpi.

După cum s-a demonstrat, fiecare limfocit individual are pe suprafață o populație de receptori avînd situsuri de combinare identice. O subpopulație sau o clonă de limfocite diferă de alta prin natura receptorilor și astfel prin natura substanțelor antigenice de care pot fi stimulate. Capacitatea organismului de a răspunde la toate antigenele pe care virtual le poate întîlni în cursul existenței sale este consecința repertoriului imens de clone diferite, fiecare purtînd receptori specifici pentru un antigen distinct. Repertoriul „teoretic" este imens și apreciat de unii cercetători la $\sim 10^{30}$ entități, cu specificități diferite.

Repertoriul real „disponibil", reprezentat de numărul unităților ce pot fi detectate la un moment dat într-un organism, este mult mai mic și variază în funcție de specie sau chiar la organismele individuale. El este apreciat la 10^{7} (Jerne, 1976), 10^{8} (Hood și colab., 1984), 10^{9} (Hanson și Wigzell, 1984) și 10^{10} tipuri diferite (Urbain și colab., 1987). Diferențele mari dintre aceste estimări reflectă dificultățile reale ale aprecierii acestei diversități. Amploarea acestui repertoriu este enormă, chiar în raport cu

valorile sale minime, ținînd seama de faptul că organismul uman conține ~10 000 tipuri diferite de proteine (structurale, de suprafață celulară, enzime, hormoni etc.) *. Deci numărul proteinelor diferite ale repertoriului imunitar este de 1 000 – 100 000 de ori mai mare decît toate celelalte tipuri diferite de proteine ale organismului uman.

Teoretic, acest repertoriu dă organismelor posibilitatea de a recunoaște nu numai orice antigen natural, dar chiar orice altă substanță sintetizată artificial pînă în prezent sau care ar putea fi obținută în viitor. Cel mai adesea, combinarea specifică dintre antigen și anticorp a fost descrisă ca rezultatul „potrivirii" dintre o cheie (determinantul antigenic) și o regiune complementară a lacătului, corespunzătoare situsului activ de combinare al anticorpului. În felul acesta, repertoriul receptorilor și Ig este echivalentul unui set imens de chei, pregătite dinainte, între care există o cheie potrivită pentru orice lacăt teoretic posibil. Cu toate acestea, organismul dispune de mecanisme suplimentare, menite să amplifice repertoriul de bază al receptorilor și Ig. Astfel, Sims și colab. (1982), precum și McKean și colab. (1984) au evidențiat capacitatea generativă înnăscută a sistemului imunitar. Ea se manifestă, între altele, prin capacitatea genelor care codifică Ig din celulele B stimulate de a fi ținta unor mutații somatice în cursul proliferării și diferențierii lor. Acest fenomen determină formarea de receptori și Ig cu regiuni variabile diferite de cele codificate de celulele-stem din care provin.

De asemenea, practica a evidențiat că afinitatea de legare (constanta de asociere) a antigenelor cu anticorpii poate varia de ~100 de milioane de ori (Nossal, 1987). Fenomenul este determinat de gradul de „potrivire" dintre determinantul antigenic și situsul de legare al receptorului sau Ig. Dacă „potrivirea" se face pe o suprafață mare a situsului de combinare, afinitatea de legare este mare; dacă potrivirea are loc numai pe porțiuni limitate, afinitatea este corespunzător mai mică, în acord cu mărimea zonei de contact.

Animalele mici de laborator au un repertoriu de celule B mai limitat (apreciat la ~10^8 tipuri diferite.

Recunoașterea diversității enorme de antigene s-ar putea explica, de asemenea, fără o potrivire perfectă, care ar permite ca același situs de combinare să poată recunoaște, cu mai multă sau mai puțină exactitate, o serie de antigene asemănătoare. Aceasta face ca sistemul imunitar să fie degenerat și redundant : un anticorp se poate uni cu mai multe antigene și un antigen se poate lega de mai mulți anticorpi. În aceste cazuri însă, nu toate „cheile" se potrivesc exact în lacăt.

După Coutinho și colab. (1980), repertoriul imunitar ar avea caracterul de „complet" („Completness") și oarecum „închis". Aceasta înseamnă că teoretic organismul poate răspunde cu producere de anticorpi specifici, față de orice moleculă străină existentă în natură sau sintetizată artificial, inclusiv față de moleculele pe care nu le-a întîlnit niciodată mai înainte.

---

* După Kourilsky și Claverie (1986), numărul moleculelor de proteine diferite din organismul uman ar fi de ordinul a ~ 25 000.

Imunocompetența

Sistemul imunitar, cu capacitatea sa imensă de a recunoaște diferite antigene și cu un spectru considerabil de răspunsuri efectoare, reglate de rețele complicate de comunicări intercelulare, se dezvoltă într-un interval de timp foarte scurt, în cursul perioadei de gestație. Unele evenimente ale procesului de dezvoltare sînt stocastice, altele (cele mai multe) evoluează într-un mod organizat și previzibil. Ca urmare, capacitatea de reacție a sistemului imunitar — competența imunologică — se instalează foarte timpuriu, cele mai multe organisme tinere, aparținînd la diferite specii, fiind capabile să răspundă agresiunilor externe (tabelul nr. 1).

Tabelul nr. 1

Apariția unor răspunsuri de tip imun la unele vertebrate

Specia	Răspunsul demonstrat	Etapa de dezvoltare	Referința* informației
Broască	Anticorpi	Larvă 6000 celule/splină	De Pasquier (1975)
Găină	IgM	14/21 zile *in ovo*	Solomon (1971)
Șoarece	Anticorpi	17/21 zile *in utero*	Sherwin și Rowlands jr. (1975)
Oaie	Anticorpi	40/150 zile *in utero*	Silverstein (1973)
Om	Anticorpi	15/39 săptămîni *in utero*	Silverstein și Lukes (1962)
Om	Celule T	11/39 săptămîni *in utero*	Strites și colab. (1972)

*Datele provenite de la animale au fost obținute direct, prin studii experimentale. Cele de la om sînt deduse prin examene histopatologice, în urma unor infecții congenitale.

Numărul relativ mic de celule limfoide * prezente la unele animale, în momentul dobîndirii competenței imunologice, pune problema unei posibile multipotențialități în perioadele timpurii ale dezvoltării lor (Silverstein, 1981).

Răspunsul imun ca reacție adaptativă a organismului

Spre deosebire de mecanismele de rezistență sau de imunitate înnăscută („Innate immunity"), care asigură protecția nespecifică a organismului față de diferite agresiuni externe, răspunsul imun are caracter

* Celule limfoide: termen generic, utilizat obișnuit pentru suspensiile celulare izolate din ganglionii limfatici, splină sau sînge, reprezentînd, în realitate, amestecuri heterogene de limfocite (ele înșile foarte heterogene), macrofage, rare plasmocite, unele granulocite și hematii (Eisen, 1976).

adaptativ. Acest caracter decurge din orientarea specifică a reacţiilor sale, care sînt îndreptate spre un anumit agent patogen sau o anumită substanţă nonself. Ele sînt determinate de mobilizarea unor celule preprogramate, care „aşteaptă" să fie activate de un anumit agent specific, corespunzător specificităţii lor.

Răspunsul adaptativ are o serie de particularităţi esenţiale, care, în ansamblu, determină eficienţa sa atît de marcată:

1) Acţionează strict specific, pe baza capacităţii sistemului imunitar de a deosebi substanţele self de cele nonself şi de a recunoaşte o diversitate enormă de substanţe nonself.

2) Acţionează cu o mare economie de mijloace, deoarece selecţionează şi activează numai subpopulaţiile celulare corespunzătoare substanţei nonself respective, toate celelalte celule şi molecule rămînînd disponibile pentru alte interacţiuni.

3) Eficienţa mare decurge din capacitatea de amplificare a efectelor sale prin: a) proliferarea masivă a celulelor selecţionate; b) modificările calitative funcţionale induse de diferenţiere şi maturare, care duc la apariţia celulelor efectoare cu mare capacitate de acţiune şi a celor cu memorie; c) producerea unor cantităţi mari de molecule de recunoaştere, sub forma unor receptori de substanţe nonself liberi (anticorpii), dirijaţi direct spre ţintă, capabili să neutralizeze, să imobilizeze sau să elimine agresorii; d) producerea unor mediatori biologic activi cu rol stimulator al diferitelor interacţiuni celulare, cum sînt interleukinele, interferonii ş.a.

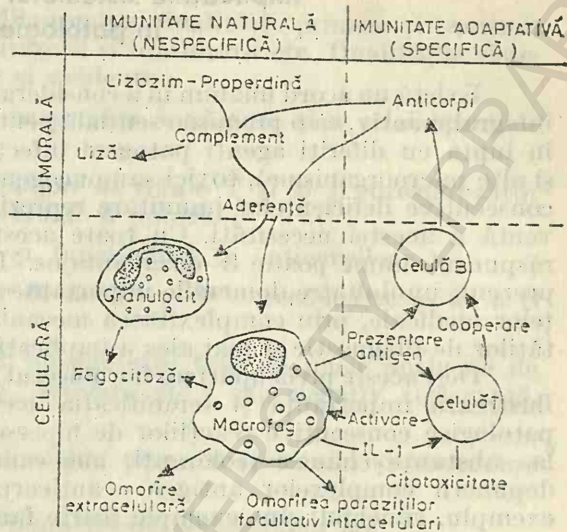
4) Celulele sistemului imunitar sînt capabile să interacţioneze stimulator cu numeroase alte celule şi mecanisme capabile să confere rezistenţă, inclusiv cu mecanismele nespecifice (neadaptative) ale imunităţii naturale (fagocitoza, sistemul complement, substanţele bactericide sau bacteriolitice din serul normal etc.) (fig. 2). Întrucît intrarea în acţiune a răspunsului adaptativ necesită o perioadă de timp, reacţiile neadaptative, mai prompte, acţionează imediat ca primă linie de apărare şi îşi continuă activitatea pe întreaga perioadă, pînă la îndepărtarea substanţelor nonself (fig. 3).

5) Reacţiile adaptative asigură şi protecţia descendenţilor unui organism imun, prin transferul transplacentar al anticorpilor şi/sau prin lapte şi au, în plus, o proprietate fundamentală unică, memoria imunologică.

În ansamblu, funcţionarea sistemului imunitar şi evoluţia răspunsului adaptativ sînt caracterizate printr-o mare supleţe şi o foarte mare eficienţă, asigurate prin punerea în acţiune a mai multor strategii diferite, menite să neutralizeze diferitele substanţe străine sau devenite străine.

Întreaga activitate este controlată genetic şi supusă unui număr mare de mecanisme de reglare, care modulează interacţiunile constituenţilor celulari şi/sau ale moleculelor de mediatori, amplificîndu-le enorm sau, din contră, atenuînd sau chiar represînd răspunsul imun, în funcţie de nevoile organismului.

Fig. 2. — Reprezentare schematică a interacțiunilor dintre mecanismele imunității naturale (nespecifice) și ale imunității specifice adaptative (după Playfair, 1974).



Imunitatea naturală (nespecifică)
Imunitatea adaptativă (specifică)
IMUNITATE
INFECȚIE → GRANULOCITE → MACROFAGE → LIMFOCITE
Limfokine
Activarea celulelor T
Monokine (IL-1)
Activarea celulelor B → Anticorp
Factori activatori ai limfocitelor
Prezentarea antigenelor
Recunoașterea specifică
Migrarea chemotactică
Activitate microbicidă
Fagocitoză → Complexe antigen-anticorp
Recunoașterea antigenelor → Legare Fc Opsonizare
Chemotaxine
Lezarea invadatorului → Migrarea chemotactică
Activitate bactericidă
Producere de complement → Liză
Interferon
Fagocitoză → Complexe antigen-anticorp
Chemotaxine
Lezare celulară → Migrarea chemotactică
Toxine → Neutralizare
Invadator → Omorîre

Fig. 3. — Reprezentare schematică de ansamblu a reacțiilor de apărare nespecifică și imunitară față de diferiți agenți patogeni, evidențiind diferitele lor interacțiuni (după Götze și Dias da Silva, 1986).

Implicațiile sistemului imunitar în patologie

Există un acord unanim în a considera existența unui sistem imunitar integral reactiv, ca o premisă esențială pentru supraviețuirea organismelor în lupta cu diferiți agenți patogeni infecțioși (viroizi, virusuri, bacterii și alte microorganisme), toxici sau oncogeni. Numeroasele stări patologice consecutive deficiențelor imunitare reprezintă confirmarea cea mai elocventă a acestei necesități. Cu toate acestea, în anumite circumstanțe, răspunsul imun poate fi dezavantajos. Imunopatologia reprezintă, în prezent, unul dintre domeniile importante și de mare dificultate ale științelor medicale, prin complexitatea mecanismelor patogenetice, a dificultăților de diagnostic și mai ales a implicațiilor terapeutice.

Deși aceste preocupări nu fac obiectul lucrării de față, cîteva exemple ilustrează importanța și semnificația acestui domeniu. Diferitele stări patologice consecutive reacțiilor de hipersensibilitate, alergia la polen și la substanțe chimice (coloranți, medicamente etc.), bolile consecutive depunerii complexelor antigen — anticorp la nivelul unor organe (de exemplu, rinichiul) sînt exemple foarte familiare, care ilustrează efectele unui răspuns imun nedorit. Reacțiile imunitare anormale ca intensitate și/sau natură pot sta la baza unor boli autoimune, care afectează grav diferite țesuturi și organe. Un alt exemplu de implicare a sistemului imunitar în patogenia unei boli este reprezentat de accidentele de tipul eritroblastozei fetale (maladia hemolitică a nou-născutului) determinată de anticorpii materni. În sfîrșit, respingerea imunitară a transplantelor de țesuturi și organe, corelate, în unele cazuri, cu funcții vitale, reprezintă încă un exemplu dramatic dintr-o gamă foarte largă de situații asemănătoare.

Analogii între sistemul imunitar și sistemul nervos

Evoluția cunoștințelor asupra sistemului imunitar a evidențiat existența unor analogii cu sistemul nervos, care au fost semnalate sporadic de diferiți cercetători. O încercare de sistematizare a acestor date scoate în evidență numeroasele analogii, dar, în același timp, și deosebirile inerente decurgînd din structura și funcțiile specifice proprii celor două sisteme. La baza acestor analogii stau, în primul rînd, complexitatea funcțională și structura de rețea, cu o comportare specifică, în principal supresoare, dar deschisă față de stimulii exteriori ai sistemului imunitar, demonstrată în ultimele decenii.

Cele două sisteme se diferențiază de alte organe din corp prin capacitatea lor de a răspunde adecvat la o varietate enormă de semnale din mediu: sistemul nervos este implicat în recepția și răspunsul față de stimuli la nivel de organism; sistemul imunitar recunoaște substanțele străine care pătrund în organism la nivel molecular.

Ambele sisteme prezintă dihotomii și dualități : primesc și transmit semnale, utilizează semnele excitatorii și inhibitorii etc. Dualitățile sistemului imunitar sînt numeroase și evidente :

1) existența „imunității" nespecifice înnăscute și a celei specifice adaptative ;

2) prezența a două tipuri majore de celule T și B și corespunzător lor a răspunsului imun mediat celular și umoral ;

3) dualitatea structurală și funcțională a anticorpilor ;

4) capacitatea moleculelor de anticorp de a recunoaște și de a fi recunoscute ;

5) capacitatea limfocitelor sensibilizate față de unele antigene de a răspunde pozitiv (proliferare, activare etc.) sau negativ (toleranță, supresie) ;

6) prezența unor organe limfoide primare (centrale) și secundare (periferice) ;

7) existența unui răspuns imun primar și secundar etc.

Cele două sisteme pătrund în cele mai multe țesuturi ale organismului, dar sînt separate, în mod paradoxal, unul de celălalt prin bariera hematoencefalică, ce împiedică limfocitele să intre în contact cu celulele sistemului nervos central.

Sistemul nervos este format dintr-o rețea de $\sim 10^{10}$ neuroni, dispuși în poziții fixe, în creier, măduva spinării, ganglionii nervoși. Ei sînt interconectați într-o rețea complexă prin intermediul axonilor și dendritelor, care formează conexiuni sinaptice cu anumite seturi de celule nervoase. Capacitatea lor de a forma sinapse numai cu setul corespunzător de alți neuroni necesită, probabil, intervenția unui sistem de recunoaștere asemănător celui al determinanților antigenici (epitopi) cu receptorii respectivi.

Limfocitele, care sînt de ~ 100 de ori mai numeroase decît neuronii, se deplasează liber în circulația sanguină și limfatică, precum și în diferite organe. „Rețeaua" imunitară rezultă din capacitatea lor de a recunoaște și de a fi recunoscute, de a interacționa, fie prin întîlniri directe (celulă — celulă), fie prin intermediul anticorpilor pe care îi formează, fie prin cel al mediatorilor biologic activi. Ca și în cazul sistemului nervos, modularea activității rețelei imunitare de diferitele semnale străine (influențe endocrine, stress etc.) reprezintă adaptarea ei la contactul cu lumea exterioară.

Ambele sisteme „învață" prin experiență, au „memorie", care poate fi susținută prin consolidare și este „înscrisă" în modificări persistente ale rețelei, dar nu poate fi transmisă la descendenți.

Vogler-Lawton (1985) scoate în evidență unele similarități care apar încă din ontogenie :

1) Interconexiunile complexe ale neuronilor, care eventual creează inteligența, ca și nivelele inferioare de activități senzoriale și motorii se dezvoltă în mod foarte ordonat, dirijat, în ultimă instanță, de informația genetică. La naștere, capacitatea de a învăța este foarte dezvoltată, dar deprinderile, produs al educației, lipsesc integral. Nașterea marchează începutul creșterii capacității intelectuale, al educației.

2) Studiul ontogeniei sistemului imunitar a permis stabilirea ordinii stadiilor de diferențiere celulară, corelarea evenimentelor moleculare și morfologice ale diferențierii, precum și separarea relativ clară a fenomenelor implicate în producerea „inteligenței" de cele care apar consecutiv educației.

3) După Vogler-Lawton, „inteligența" sistemului imunitar ar fi reprezentată de capacitatea sa de a recunoaște o populație extrem de diversă de determinanți antigenici. Spre deosebire de sistemul nervos, funcția de „inteligență" a sistemului imunitar (producerea diversității clonale a limfocitelor) se manifestă periodic în funcție de agresiunile externe, în tot cursul vieții organismului. Deprinderile decurgînd din educație ar putea fi reprezentate de limfocitele efectoare, de anticorpii specifici și de celulele cu memorie. Datorită sistemului de apărare matern și placentei, fătul este, în general, apărat de contactul cu antigenele străine din mediu. „Educația" sistemului imunitar începe, de asemenea, după naștere. La naștere, multe dintre mecanismele umorale și celulare implicate în apărare sînt deficitare. Sistemul imunitar este relativ ineficient sub raportul capacității de a iniția un răspuns imun specific.

Unele date recente relevă asemănări, greu de interpretat în prezent, ca, de exemplu : 1) prezența unor structuri de suprafață (ca antigenele Thy-1 și MRC OX_2) atît pe limfocitele T, cît și pe celulele nervoase și păstrarea lor în cursul evoluției ; 2) faptul că unii mediatori ai sistemului imunitar (ca interleukina-2) acționează și asupra sistemului nervos central producînd febră și somn profund etc.

Analiza amănunțită a cunoștințelor actuale asupra celor două sisteme demonstrează cu evidență faptul că sistemul imunitar rivalizează cu cel nervos prin sensibilitatea, specificitatea și complexitatea răspunsului și reacțiilor sale, decurgînd din controlul genetic al diversității celulelor și anticorpilor, din asocierile specifice ale celulelor cu antigenele, din arhitectura complicată a țesuturilor limfoide, care stimulează interacțiunile celulare, din mecanismele precise de eliminare a antigenelor, ca și prin funcția de memorie.

După Jerne (1973, 1985),aceste asemănări de exprimare și comportament între cele două sisteme ar putea avea la bază unele analogii între seturile de gene care codifică structurile și controlează dezvoltarea și funcția lor.

Originea sistemului imunitar

Studiul evoluției fenomenelor de recunoaștere și de respingere a transplantelor de țesuturi și de organe în scara animală sugerează că sistemul imunitar a evoluat, probabil, de la un sistem de recunoaștere mai primitiv, a cărui funcție nu a fost imunitatea, ci capacitatea de a deosebi celulele proprii de cele ale altor membri ai speciei.

Este probabil că precursorul sistemului imunitar prezent la metazoarele foarte primitive a dispus de un mecanism de recunoaștere a altor membri ai speciei, îndeplinind funcții potențiale ca : 1) împiedicarea fuziunii celulelor cu natură diferită ; 2) stimularea diversității genetice

prin derivă mutațională ; 3) asigurarea răspîndirii speciei pe o mare parte din teritoriu ; 4) reducerea competiției pentru aprovizionarea cu alimente limitate cantitativ (Schwartz, 1984).

Acest sistem, cu grade diferite de complexitate, s-a format probabil prin duplicarea genelor pentru o singură pereche de molecule donator — receptor. Un astfel de sistem primitiv de recunoaștere a moleculelor self este utilizat, probabil, și de organismele monocelulare, cum sînt protozoarele, pentru a împiedica autodistrugerea pseudopodelor proprii prin fagocitoză (Paul, 1984). Pe plan biologic general, fenomenele de recunoaștere self — nonself au avut un rol esențial în evoluție.

Sistemul imunitar ar fi evoluat din nevoia celor mai primitive organisme multicelulare de a recunoaște alte celule de același fel și de a stabili o rețea de interacțiuni cooperante între ele, în vederea dezvoltării organelor specializate. Condiția fundamentală a funcționării acestor mecanisme de comunicare intercelulară a fost capacitatea de a discrimina substanțele self de cele nonself, pe bază de complementaritate moleculară.

În cursul evoluției, acest sistem de recunoaștere primitiv a preluat o a doua funcție, la fel de importantă, de eliminare a celulelor și substanțelor străine care pătrund în organism. Paralel s-a produs și diversificarea sa structurală și funcțională.



Teleonomia evidentă a sistemului imunitar este cea de apărare a organismului-gazdă de agresiunile externe sau, mai rar, de cele interne. El funcționează ca un al șaselea simț, care permite organismului să recepționeze și să răspundă la stimuli străini (virusuri, bacterii, alte microorganisme, paraziți, substanțe chimice, celule tumorale etc.), nerecunoscuți nici de cele cinci simțuri și nici de sistemul nervos central sau periferic. Acest fel de protecție față de diferite agresiuni este realizat, în fiecare organism, printr-un control cibernetic al interacțiunilor dintre celulele și moleculele care determină diferitele reacții imunitare.

Eficiența deosebită a sistemului imunitar este ilustrată de menținerea stării de sănătate a organismului uman, deși o serie de date demonstrează gradul enorm de expunere față de contactul cu diferite microorganisme sau cu agenți potențial agresivi din mediu. Astfel, suprafața de contact cu mediul extern a omului adult este de ~ 300 m^2 în cazul mucoasei intestinale și de ~ 80 m^2 în cazul celei respiratorii (Mountcastle, 1977 ; Bocci, 1985). Un argument suplimentar este furnizat de faptul că omul adult poartă în organism $\sim 10^{14}$ bacterii vii (față de numai $\sim 10^{13}$ celule proprii organismului) (Luckey, 1972 ; Ralbaud și Ducluzeau, 1984). Informațiile percepute de sistemul imunitar ar putea fi transmise, de asemenea, sistemelor hormonale și, probabil, chiar unor celule diferențiate, prin intermediul moleculelor biologic active produse în cursul activității sale.

În felul acesta, datorită componenților săi circulanți, sistemul imunitar, ca și cel endocrin, ar putea acționa în organism pentru a controla situsuri îndepărtate de locul în care a fost stimulat. Pe plan biologic general, nu este exclus ca descifrarea interacțiunii sistemului imunitar cu alte organe să evidențieze un rol suplimentar, fundamental pentru echilibrul intern al organismului.

Gramatica generativă a sistemului imunitar

Sub acest titlu, în cuvîntul său ocazionat de decernarea premiului Nobel, Jerne (1985) încearcă să explice unele proprietăți fundamentale ale sistemului imunitar, recurgînd la unele comparații și analogii cu conceptul de gramatică generativă, elaborat de Chomsky (1964, 1972).

În acord cu acest demers, gramatica funcționează ca un dispozitiv (alcătuit la modul ideal dintr-un component central sintactic, unul fonologic și altul semantic) capabil să specifice un set infinit de propoziții, bine formate, atribuind fiecăreia dintre ele una sau mai multe descrieri structurale. Ca urmare, un vorbitor matur poate să formuleze o propoziție normală a limbajului său, iar alți vorbitori îl pot înțelege imediat, deși propoziția respectivă este deopotrivă de nouă pentru ei. Această capacitate de exprimare a unei diversități uimitoare de idei este realizată practic, de toate limbajele, cu un vocabular de cel mult 100 000 de cuvinte (respectiv de 1 000—100 000 de ori mai mic decît estimările limită asupra repertoriului potențial al sistemului imunitar) (vezi cap. „Bazele genetice ale diversității anticorpilor").

Complexitatea enormă a sistemului imunitar, capacitatea lui de a reacționa față de un număr teoretic indefinit de substanțe „străine" sugerează unele analogii mai mult sau mai puțin superficiale, deși evidente, cu limbajul uman, cu toate că sistemul imunitar a evoluat și funcționează ca sistem cognitiv, independent de asistența creierului. Ca și în alte domenii ale imunologiei, cele mai multe analogii se referă, în general, la anticorpi și la moleculele de Ig-anticorp de pe suprafața celulelor B cu rol de receptori de antigen, deși ele sînt valabile și în cazul celulelor T și a receptorilor respectivi de antigen.

Jerne, a cărui argumentare o redăm pe larg, pentru interesul prezentat, consideră că regiunile variabile ale Ig (prin secvența aminoacizilor, diferită în funcție de specificitatea fiecăreia) pot fi comparate cu o propoziție sau cu o frază. Ca urmare, repertoriul imens al anticorpilor sistemului imunitar devine un vocabular format nu din cuvinte, ci din propoziții capabile „să răspundă" la orice „frază" exprimată de multitudinea de antigene, pe care organismul le poate întîlni în cursul existenței sale. Răspunsul imun poate fi asimilat cu capacitatea sistemului imunitar de a răspunde la o „frază" prezentată de o moleculă invadatoare (antigen), selecționînd din repertoriul imens al anticorpilor preformați, prezenți în organism, o imagine în oglindă (situsul de legare complementar al moleculei de Ig) corespunzătoare unei părți (determinantul antigenic sau gruparea determinantă de specificitate) din fraza antigenică. Anticorpii cu funcție de recunoaștere nu apar ca rezultat al pătrunderii antigenului invadator, ci sînt, așa cum s-a demonstrat, deja formați în repertoriul sistemului imunitar înainte ca antigenul să pătrundă în organism. Ca și limbajul, care dispune de un vocabular limitat, sistemul imunitar are un „lexicon" de bază, reprezentat de informația genetică codificată în genele pentru Ig din celulele germinale.

Experimental, s-a demonstrat capacitatea „generativă" a sistemului imunitar, exteriorizată prin posibilitatea apariției unor evenimente mutaționale în celulele B proliferante. Ea permite formarea de anticorpi cu

regiuni variabile diferite de cele codificate de celulele-stem din care s-au format precursorii celulelor B. Experimental, după cum au demonstrat studiile lui Sims și colab. (1982) și ale lui McKean și colab. (1984), identificarea genelor celulei-stem originare a devenit posibilă prin cercetări considerate de Jerne (1985) ca aparținînd, în termeni lingvistici, etimologiei sistemului imunitar. Abordarea generativă a gramaticii explică posibilitatea oricărei limbi de a putea formula, utilizînd un vocabular de bază limitat, o infinitate de enunțuri, deoarece nu există nici o limită în numărul de propoziții diferite ce pot fi exprimate într-o anumită limbă.

Pentru a marca această particularitate a limbajului, Chomsky o descrie ca „o închidere care se deschide" („open-endedness") (engl. „open" = deschis; „ended" = încheiat, sfîrșit; „ness" = exprimă o calitate).

Prin analogie, Jerne consideră că, cu oarecare imaginație, capacitatea sistemului imunitar de a răspunde practic la orice substanță, naturală sau artificială, sintetizată pînă în prezent sau care va fi sintetizată în viitor, poate fi socotită analogă cu această proprietate a limbajului. Pe această bază, el consideră că sistemul imun poate fi mai corect caracterizat ca „închis, dar capabil să se deschidă" („Open-ended") decît cu termenul de „complet" („Completness"), propus de Coutinho (1980).

O altă concluzie cu importanță fundamentală decurge din faptul că, după Jerne, în starea sa de echilibru dinamic normal, sistemul imunitar este, în principal, orientat spre mediul intern, propriu organismului din care face parte („Self-centered"). Datorită acestui comportament, el produce anticorpi antiidiotipici față de proprii săi anticorpi, care datorită structurii lor particulare reprezintă majoritatea copleșitoare a antigenelor prezente în organism. Acest echilibru, relativ precar în raport cu alți constituenți, permite reacții puternice ori de cîte ori organismul este invadat de agenți infecțioși (virusuri, bacterii, microfungi, protozoare) sau de substanțe chimice străine nedorite, care incidental tulbură armonia dinamică a sistemului.

ANTIGENE ȘI ANTICORPI

„Anticorpii... moleculele centrale ale imunității adaptative"

H. N. EVANS

„Antigene și anticorpi... două cuvinte destinate să formeze unul din cuplurile inseparabile, ca Romeo și Julieta sau Laurel și Hardy"

J. LINDENMANN

Antigenele

„Nimeni nu poate defini un antigen în termeni exacţi. Cel mai adesea, antigenele sînt definite în funcţie de anticorpii pe care îi produc. Din nefericire, anticorpii sînt definiţi în funcţie de antigenele care au indus apariţia lor. Rezultă o serie de definiţii indirecte, aproape lipsite de sens."

J. T. Barrett

În mod convenţional, antigenele sînt definite ca substanţe care introduse în organismul unui animal, pe cale parenterală, declanşează producerea de anticorpi cu care reacţionează în mod specific. Definiţia este echivocă şi incompletă, deoarece eludează o serie de fapte de observaţie cu care vine în contradicţie :

1) Calea digestivă nu exclude posibilitatea unui răspuns imun, deşi o parte din substanţele antigenice sînt degradate de enzimele digestive. Ea asigură o bună imunizare, în special, în cazul agenţilor infecţioşi capabili de replicare (de exemplu, vaccinul antipolio oral, atenuat etc.), deşi, în general, calea parenterală de imunizare este mai eficientă.

2) Răspunsul imun este un fenomen foarte complex şi cuprinde fenomene pe care definiţia le exclude, ca, de exemplu, toleranţa imună sau hipersensibilitatea de tip întîrziat (care este o expresie a imunităţii mediate celular). Caracterul limitativ al definiţiei ignoră aceste procese foarte importante.

3) Anticorpii produşi de imunizarea cu *Bacillus anthracis* reacţionează cu un polimer izolat din peretele acestuia, acidul poli-γD-glutamic, care nu este antigenic şi nu produce anticorpi, dacă este injectat la animale de experienţă (Roelants şi Goodman, 1968).

4) Uneori, funcţia de antigen, în sensul definiţiei citate, este condiţionată de alţi factori. Spre exemplu, soluţiile saline de polizaharide pneumococice, injectate intra- sau subcutanat la om sau la şoarece, induc producerea unor concentraţii mari de anticorpi, în timp ce injectarea pe alte căi, ca şi utilizarea iepurelui ca animal de experienţă sînt fără rezultat.

5) Unele substanţe pot fi etichetate fals ca neantigenice numai pentru că nu induc reacţii antigen—anticorp *in vitro*. Într-o încercare de a ocoli limitele şi inconvenientele definiţiilor tradiţionale, J.F. Bach (1974) consideră antigenele ca molecule care, introduse în organismul unui animal, induc un răspuns imun, adică declanşează un proces biologic complex ce implică, în special, proliferarea celulelor limfoide şi determină sinteza de molecule de recunoaştere, anticorpi şi receptori celulari, care au proprietatea de a se combina *in vivo* şi *in vitro* cu antigenul inductor.

Termenul de antigen a fost folosit pentru prima dată de Deutsch (1899), Deutsch şi Feistmantel (1903), Lindenmann (1984). Utilizînd

antigene sintetice pentru descifrarea fenomenelor imunologice, Sela (1969) disociază două proprietăţi distincte, definitorii pentru substanţele antigenice : 1) Imunogenitatea, respectiv capacitatea de a provoca un răspuns imun de novo, ori de cîte ori pătrund în organismul unui animal, capabil să răspundă la acest stimul şi 2) Specificitatea antigenică reflectată în natura situsului de combinare a anticorpilor, care permite determinanţilor antigenici elementari să recunoască specific anticorpii complementari formaţi sub influenţa lor şi să se combine cînd vin în contact cu aceştia. Într-o analogie formală cu enzimele, care au situsuri catalitice şi situsuri de specificitate, Sela (1969) diferenţiază în structura antigenelor regiuni necesare pentru a face produsul imunogen şi regiuni care contribuie la specificitatea antigenelor. Această dualitate funcţională a antigenelor are ca suport faptic cel puţin două procese, demonstrate fără echivoc : 1) în cazul antigenelor sintetice, specificitatea răspunsului imun poate fi dirijată atît faţă de porţiunea haptenică a antigenului, cît şi faţă de suportul macromolecular cu rol de purtător („carrier") ; 2) recunoaşterea celor doi constituenţi ai antigenelor sintetice, haptena şi molecula-purtător, implică participarea a două categorii de celule limfoide, celulele T şi celulele B. Cu toate aceste deosebiri nete, mulţi cercetători folosesc termenii de antigen şi imunogen ca echivalenţi, cel puţin în limbajul curent.

Clasificarea antigenelor

Studiul proprietăţilor imunogene a fost efectuat pe patru categorii de substanţe :

1) *Antigenele naturale*, reprezentate de molecule cu origine naturală (provenite din virusuri, microorganisme, plante şi animale). Virusurile, bacteriile, toate celelalte tipuri de celule sînt denumite obişnuit antigene, deşi ele sînt, în realitate, amestecuri multimoleculare de polideterminanţi antigenici. Chiar proteinele sînt cel mai adesea antigene complexe, deoarece posedă, de regulă, un mozaic larg de determinanţi antigenici.

2) *Antigenele artificiale* sînt antigene naturale modificate chimic, prin cuplarea, cel mai adesea, prin legături covalente a unei sau mai multor molecule mici, noi, care le schimbă specificitatea (Landsteiner, 1945, 1968). Antigenele artificiale utilizate cel mai frecvent sînt aşa-numitele conjugate haptenă-proteine.

3) *Antigenele sintetice* sînt molecule obţinute integral, în laborator, pe cale de sinteză (Sela, 1960, 1969 ; Arnon şi Sela, 1983).

4) *Haptenele* sînt substanţe chimice naturale sau de sinteză, cu moleculă mică, a căror imunogenitate este condiţionată de cuplarea cu o moleculă-purtător.

Terminologie

Determinant antigenic : structură prezentă pe suprafaţa moleculei de antigen, capabilă să se combine cu o singură moleculă de anticorp. Este reprezentată de o secvenţă anumită de subunităţi sau de o anumită conformaţie spaţială, care pot fi recunoscute de situsul de combinare

(paratopul) prezent pe molecula de Ig. Sinonime : epitop, situs antigenic, grupare determinantă de specificitate.

Purtător („carrier") : moleculă de natură proteică, polizaharidică sau sintetică, cu rol de suport macromolecular în structura antigenului. Conferă proprietăţi imunogene haptenelor după cuplare.

Haptenă : substanţă, în general cu greutate moleculară mică, incapabilă *per se* să determine formarea de anticorpi. Poate deveni imunogenă după cuplarea cu o proteină sau cu altă substanţă cu rol de „purtător". Reprezintă cea mai mică unitate structurală recunoscută de un anticorp.

Motiv antigenic : structură sau ansamblu de structuri ale unui antigen, care participă în combinarea acestuia cu o populaţie de anticorpi. Reprezintă cea mai mare unitate de structură recunoscută de o populaţie de anticorpi. Sinonim: specificitate antigenică.

Profil antigenic : totalitatea determinanţilor antigenici localizaţi pe suprafaţa unei celule.

Imunodominant : parte a determinantului antigenic cu importanţă deosebită în definirea specificităţii lui şi în legarea cu antigenul.

Imunopotenţă : capacitatea unei regiuni din molecula de antigen de a servi ca determinant antigenic şi de a induce formarea de anticorpi. Reprezintă o expresie cantitativă a „tăriei" unui determinant antigenic.

Imunologic „tăcut" („Immunosilent") : determinant antigenic „ascuns", care poate deveni imunopotent în urma denaturării chimice sau după fragmentarea antigenului din care face parte.

Ligand : orice tip de moleculă capabilă să formeze un complex cu altă moleculă (spre exemplu, un antigen cu anticorpul, în reacţia de precipitare).

Autoantigen : antigen propriu unui organism, care în anumite condiţii poate induce formarea de autoanticorpi în organismul animalelor de la care provine. Sinonime : antigen autolog, antigen self.

Heteroantigen : antigen care aparţine altei specii decît cea la care este introdus în cursul imunizării (spre exemplu, antigenele virale sau bacteriene pentru om).

Tolerogen : substanţă capabilă să inducă în special toleranţă imunitară în loc de sinteză de anticorpi. Unele substanţe, ca, de exemplu, polizaharidul de la *Streptococcus pneumoniae* pot fi imunogene sau tolerogene în funcţie de doză sau de calea de administrare.

Alergen : antigen care produce o sensibilizare alergică prin acţiunea anticorpilor de tip IgE.

Animale singenice (engl. „syngeneic") *:* linie genetică pură de organisme, cu patrimoniu genetic identic, de tipul gemenilor monozigoţi sau practic identic de tipul animalelor obţinute prin încrucişări consanguine (engl. „inbred strains").

Animale „outbred” — animale cu structură genetică opusă liniei pure, caracterizate printr-o mare diversitate genetică şi diferenţe mari între antigenele de histocompatibilitate purtate de diferiţii indivizi, ca rezultat al încrucişărilor aleatorii.

Determinanţii antigenici

Deşi macromoleculele şi celulele sînt denumite curent antigene (sau imunogene), în realitate, răspunsul imun indus este îndreptat faţă de porţiuni discrete, limitate, ale lor, numite determinanţi antigenici (grupări determinante de specificitate), care se combină cu situsul activ al Ig şi determină specificitatea reacţiilor antigen—anticorp. Capacitatea unei regiuni a moleculei de antigen de a servi ca determinant antigenic şi de a induce formarea de anticorpi specifici este numită *imunopotenţă*. Determinanţii antigenici sînt echivalenţi situsurilor catalitice ale enzimelor pentru că, asemenea acestora, reprezintă „cheia” activităţii funcţionale a antigenelor. Determinanţii antigenici nu sînt obligatoriu segmente lineare ale moleculelor polipeptidice sau polizaharidice. De aceea, este posibil ca în cazul proteinelor cu structură cuaternară un determinant antigenic să poată fi format din 6—8 aminoacizi, situaţi cîte 3—4 pe lanţuri diferite, dar care, datorită structurii pliate a moleculei naturale, devin suficient de apropiaţi unii de alţii.

Mărimea determinanţilor antigenici. Kabat (1961) a imaginat o tehnică de apreciere indirectă a mărimii determinanţilor antigenici, în funcţie de mărimea unor haptene capabile „să umple” complet situsul de combinare a anticorpilor, inhibînd reacţia specifică antigen—anticorp. În acest scop, a folosit sistemul dextran-antidextran şi reacţia de precipitare ca revelator. Utilizarea dextranului oferă avantajul unui polimer de glucoză imunogen, cu ramificaţii relativ puţine, precum şi posibilitatea preparării relativ uşor a unor oligozaharide cu dimensiuni mici, perfect controlabile. Utilizînd molecule cu dimensiuni crescînde, Kabat a demonstrat că efectul inhibitor al reacţiei de precipitare creşte progresiv pentru a atinge valoarea maximă cu un hexazaharid. Acesta corespunde celui mai bun ligand al anticorpilor antidextran şi deci mărimii determinantului antigenic. Heptazaharidele, ca şi oligozaharidele mai mari au o eficienţă de legare inferioară. Aceste date confirmă ipoteza că fiecare subunitate a determinantului antigenic contribuie la energia de legare în cursul reacţiilor antigen—anticorp. Mărind dimensiunile haptenei dincolo de mărimea determinantului antigenic, în locul unei ameliorări a legării se constată un efect negativ, deoarece subunităţile adiţionale rămîn în afara situsurilor de combinare ale anticorpilor (fig. 4).

Cercetări similare au fost efectuate cu homopolimeri de aminoacizi (Lys sau Ala), legaţi de proteine-purtător. După administrare parenterală la iepure aceştia induc formarea de anticorpi, care au fost puşi să reacţioneze cu homopolimeri de diferite mărimi. S-a stabilit că un pentamer de alanină, cu volumul de $25 \times 11 \times 6{,}5$Å, are cea mai mare energie de legare de situsul activ al anticorpilor. El corespunde unui determinant antigenic şi reflectă şi dimensiunile situsului de combinare al Ig, la care se leagă pe bază de complementaritate. Dimensiunile diferiţilor determinanţi

antigenici analizați pînă în prezent sînt apropiate de cifrele menționate : 32×12×7 Å pentru hexazaharide în cazul dextranului, 27×12×6,5 Å în cazul hexalizinei, 36×10×6,5 Å pentru hexapeptidul din *Bacillus anthracis* și ~300—500 Å^2 pe suprafața moleculei de antigen. În concluzie,

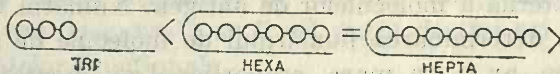


Fig.4. — Reprezentare schematică a modului în care legarea unei haptene în situsul anticorpului corespunzător permite aprecierea mărimii determinanților antigenici. În sistemul dextran—antidextran, hexaglucidul este un ligand mai bun decît oligoglucidele mai mici și egal heptaglucidului. Hexaglucidul „umple" exact situsul de legare al anticorpului, furnizînd energia maximă de legare. Glucidele adăugate în plus rămîn în afara situsului și nu pot contribui la legare (după Goodman, 1984).

mărimea medie a unui determinant antigenic poate fi apreciată la ~6—8 subunități în cazul polizaharidelor și respectiv 4—6 aminoacizi în cazul proteinelor (tabelul nr. 2).

Tabelul nr. 2

Mărimea unor determinanți antigenici tipici (după Kabat, 1976)

Antigenul	Determinantul antigenic	Mărimea în forma cea mai extinsă (Å)	Greutatea moleculară (dal)
Dextran	Izomaltohexoză	34×12×7	990
Proteina fibrilară din mătase	$Gly[Gly_3Ala_3]Tyr$	27	632
Poli-λ-D-Glu	Acid hexaglutamic	36×12×7	792
Polialanil-serum albumină bovină	Pentaalanină	25×11×6,5	373
Polilizin + fosforil-serum albumină bovină	Pentalizină	27×17×6,5	659
α-DNP-heptalizină	α-DNP heptalizină	30×17×6,5	1 080

Valența antigenelor. Numărul determinanților antigenici prezenți pe suprafața moleculelor antigenice variază în raport cu mărimea și complexitatea lor. Convențional, valența antigenelor a fost definită prin numărul de grupări determinante prezente pe un antigen sau, corespunzător, prin numărul moleculelor de anticorpi care pot reacționa cu o moleculă de antigen. Kabat (1961) a determinat valența antigenelor indi-

rect, prin reacţii antigen—anticorp în exces mare de anticorpi, măsurînd cantitatea de antigene şi de anticorpi din complexul format.

După Barrett (1976) există două tipuri de valenţe ale antigenelor:

1) Valenţele funcţionale ale antigenelor complete care au situsurile pe suprafaţa externă a moleculelor de antigen. Numărul lor, care poate fi apreciat prin determinarea numărului de molecule de anticorp ce se leagă de antigen, ar fi, în mare, proporţional cu greutatea moleculară a antigenului. Tabelul nr. 3 evidenţiază corelaţia dintre greutatea moleculară şi valenţă, precum şi existenţa unei proporţionalităţi directe la valori mai mici de g.m. 100 000 dal.

Tabelul nr. 3

Corelaţia dintre greutatea moleculară şi valenţa antigenelor (după Kabat, 1961)

Antigenul	Greutatea moleculară (dal)	Raportul molar Ag/Ac în precipitate
Ribonucleaza pancreatică bovină	13 600	3
Ovalbumină de găină	42 000	5
Albumină serică de cal	69 000	6
Gamaglobulină umană	160 000	7
Apoferitină de cal	465 000	26
Tiroglobulină	700 000	40
Hemocianină	6 500 000	74
Virusul ("Bushy stunt") nanismului tomatelor	8 000 000	90
Virusul mozaicului tutunului	40 000 000	650

În foarte multe antigene, după Barrett, situsurile de valenţă s-ar găsi la fiecare ~ 10 000 dal greutate moleculară.

2) Valenţele nefuncţionale sau „ascunse" sînt reprezentate de determinanţi antigenici interni, care nu sînt funcţionali în molecula parentală. Identificarea lor este posibilă numai după degradarea enzimatică parţială a antigenului. Astfel, serumalbumina bovină nativă (g.m. ~ 70 000 dal) are 6 situsuri funcţionale de valenţă. După degradare enzimatică se eliberează 9 fragmente peptidice, care precipită cu anticorpii anti-serumalbumină. Cum precipitarea necesită existenţa a cel puţin doi determinanţi (două

situsuri de valență), înseamnă că molecula originară conține cel puțin 18 situsuri de determinanți. Întrucît unele date sugerează că în cursul hidrolizei enzimatice ar avea loc distrugerea unor determinanți antigenici, Barrett (1976) apreciază că în cazul concret al serumalbuminei bovine valența totală (suma situsurilor de valență funcționale, plus valențele nefuncționale sau „ascunse") ar fi cel puțin de trei ori mai mare decît numărul valențelor funcționale.

Pe aceste considerente este important de reținut faptul că valorile valențelor antigenelor determinate experimental trebuie considerate ca minimale, deoarece : 1) moleculele de anticorpi sînt cel puțin bivalente ; 2) unele obstacole sterice pot împiedica ocuparea simultană a tuturor situsurilor în reacția antigen—anticorp ; 3) într-un anumit antiser nu se găsesc totdeauna anticorpi față de toți determinanții antigenului folosit pentru imunizare.

Natura determinanților antigenici ai unor antigene naturale. Studiul particularităților antigenelor naturale s-a făcut în special pe trei căi : 1) prin degradarea lor controlată ; 2) prin sinteza determinanților antigenici ; 3) prin inducerea de modificări structurale și de specificitate consecutive denaturării chimice sau termice. Cele mai multe date se referă la următoarele antigene.

Proteina fibrilară din mătase are o structură lineară, cu g.m. 50 000 — 60 000 dal și valența antigenică = 3 (se leagă de trei molecule de Ig). Degradarea enzimatică o desface la trei categorii de peptide, care inhibă reacțiile de precipitare în grade diferite : 1) dodecapeptidele sînt inhibitoarele cele mai active (50 %) ; 2) octopeptidele cu secvență Gly (Gly3-Ala3) Tyr au o activitate inhibitoare ceva mai slabă (40 %), care scade la jumătate după îndepărtarea tirozinei C-terminale, evidențiind rolul important al acestui aminoacid în imunogeneză ; 3) tetrapeptidele, deși au aceeași compoziție chimică, sînt numai slab inhibitoare. Concluzia este că determinantul antigenic (situsul de valență) al proteinei fibrilare din mătase este format din 8—12 aminoacizi, ceea ce corespunde la o lungime de ~ 2,7—4,4 nm, dacă peptidul este extins la maximum (Cebra și colab., 1961). De Préval, bazîndu-se pe proprietatea inhibitorie mai slabă, dar totuși semnificativă a peptidelor mici, consideră că, în realitate, acest situs ar fi mai mare (~ 20 aminoacizi) sau că acest număr ar fi necesar pentru a menține un determinant antigenic de 10—12 aminoacizi într-o configurație adecvată.

Proteina VMT. Virusul mozaicului tutunului (VMT) este alcătuit din 2 130 de molecule de proteine identice (g.m. 16 500 dal), avînd fiecare

158 de aminoacizi a căror secvenţă este perfect cunoscută (fig. 5) (Tsugita şi colab., 1960). Proteina VMT este alcătuită din 18 aminoacizi diferiţi (fiind lipsită de metionină şi histidină) şi este caracterizată prin prezenţa Ser la extremitatea N-terminală şi a Thr la cea C-terminală. După tratarea

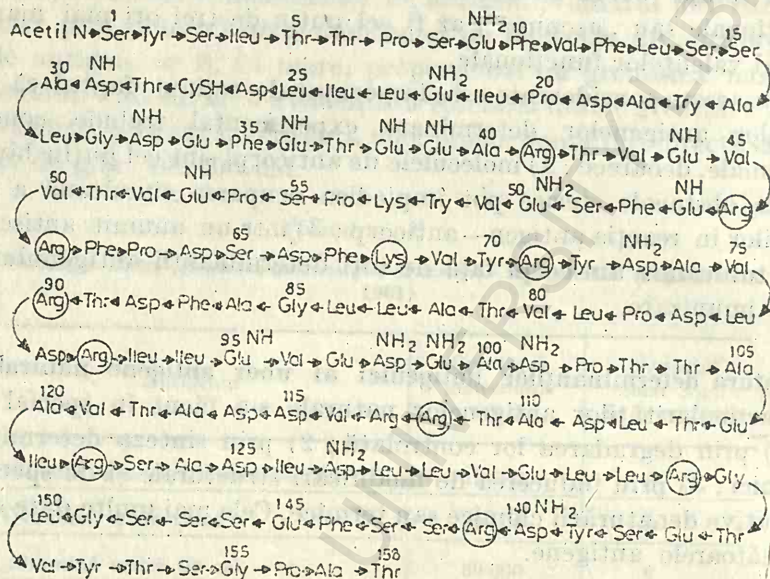


Fig. 5. — Secvenţa aminoacizilor în proteina virusului mozaicului tutunului. Aminoacizii încercuiţi (Arg şi Lys) marchează situsurile de clivare de către tripsină. Situsul antigenic esenţial este situat între resturile 93 şi 112 (după Tsugita şi colab., 1960).

cu tripsină, în condiţii controlate de mediu, este clivată la nivelul a 11 situsuri, cu formarea a 12 peptide inegale, numerotate de la I la XII, începînd de la extremitatea NH_2-terminală (fig. 5). Studiul capacităţii acestor peptide de a inhiba reacţia de fixare a complementului între proteina VMT şi serul anti-VMT a arătat că cel mai activ este peptidul VIII, care corespunde aminoacizilor din poziţiile 93—112. Analiza fină a arătat că determinantul antigenic esenţial este inclus în această secvenţă, corespunzînd aminoacizilor din poziţiile 108—112 (Leu, Asp, Ala, Thr, Arg). Este un determinant antigenic mai aparte, deoarece nu conţine aminoacizi aromatici, aşa cum se întîmplă în majoritatea cazurilor.

Ribonucleaza pancreatică bovină este, de asemenea, o proteină globulară mică (~14 000 dal), alcătuită din 124 de aminoacizi, cu secvenţă cunoscută. Aminoacizii His (12), His (119) şi Met (13) sînt esenţiali pentru activitatea enzimatică. Este hidrolizată de subtilizină într-un peptid S (20 aminoacizi) şi o proteină S (104 aminoacizi) inactive enzimatic, dar

capabile de reasociere spontană cu redobîndirea activității. Localizarea exactă a determinantului antigenic în molecula nativă nu a putut fi determinată. În molecula oxidată el ar corespunde regiunii cuprinse între aminoacizii 38 și 61 (fig. 6). Faptul că molecula denaturată cu alcali sau cu acid

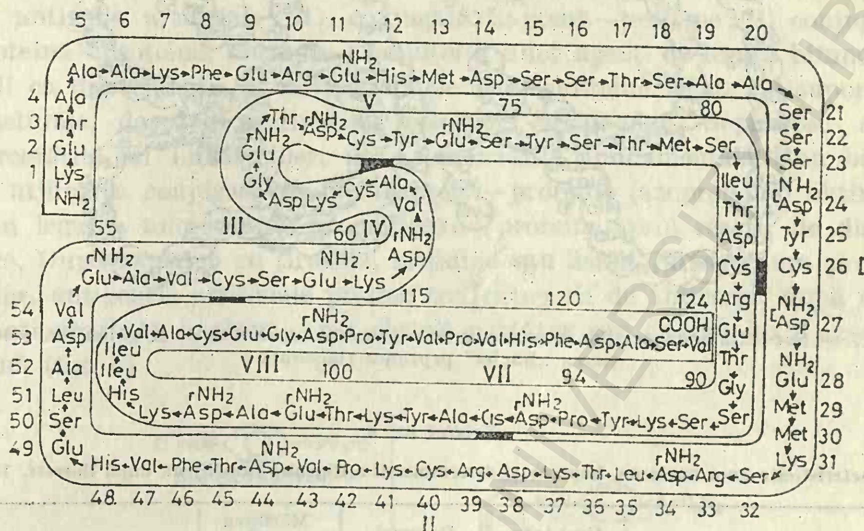


Fig. 6. — Secvența aminoacizilor în ribonucleaza bovină. Localizarea exactă a situsurilor determinante ale antigenității în molecula nativă este încă nesigură, dar nu include primii douăzeci de aminoacizi, care cuprind peptidul S. În ribonucleaza oxidată, regiunea dintre aminoacizii 38 și 61 constituie o regiune activă de legare a anticorpilor (după Smith, Stein și Moore, 1963).

performic, care rup legăturile S—S, are o capacitate diminuată de precipitare cu serul anti-RNază, demonstrează că reacțiile serologice sînt date de structura terțiară a moleculei și implică participarea ambelor fragmente S. Aceasta demonstrează caracterul de determinant antigenic conformațional în cazul ribonucleazei, deși el nu a fost exact identificat.

Lizozimul din oul de găină este, de asemenea, format dintr-un lanț polipeptidic, lung de 129 de aminoacizi (g.m. ~ 14 500 dal), ale cărei structuri primară, secundară și terțiară au fost determinate. Utilizînd aceleași tehnici, au fost evidențiate două zone determinante de antigenitate majore: 1) prima corespunde pozițiilor 57—107 ale aminoacizilor și include „bucla" peptidică (fig. 7), formată de resturile nr. 64—80 și menținută de o legătură S—S, și 2) cel de-al doilea determinant, care absoarbe ~ 50% din anticorpii produși față de molecula întreagă, corespunde pozițiilor 7—27 și 122—129 ale aminoacizilor în polipeptid. Tabelul nr. 4 reunește sintetic particularitățile acestor determinanți naturali, comparativ cu haptenele și antigenele sintetice.

Fig. 7. — Secvenţa aminoacizilor în molecula de lizozim din albuşul de ou de găină, cu evidenţierea „buclei" peptidice (haşurat).

Tabelul nr. 4

Caracteristicile unor antigene, haptene şi determinanţi antigenici (modificat, după Barrett, 1976)

	Antigenul sau haptena	Greutatea moleculară (dal)	Determinantul antigenic	Mărimea determinantului (dal)	Structuri importante în imunogeneză
Antigene naturale	Proteina fibrilară din mătase	50 000—60 000	Octapeptid	748	Aminoacizi terminali
	Proteina virusului mozaicului tutunului	16 500	Pentapeptid	646	Grupări hidrofobe
	Ribonuclează	14 000			Structură terţiară
	Dextran	50 000—100 000	Izomaltoză	990	Complexitate internă redusă
Antigene sintetice	Poliaminoacizi $G_{52}A_{33}T_{10}$*	4 100	Hexapeptid	792	Greutate moleculară mică Legarea necovalentă necesară pentru formarea determinantului antigenic
	$G_{60}A_{30}T_{10}$	13 300	Hexapeptid	792	
	Haptene	1 000	Variabil	<1 000	Grupări acide şi terminale + structură terţiară

* Cifrele indică proporţia aminoacizilor respectivi în polimer.

G = Glicocol A = Alanină T = Treonină

Antigenele artificiale

Utilizarea antigenelor artificiale pentru studiul mecanismelor imunitare și al specificității reacțiilor antigen—anticorp a fost inițiată de Landsteiner (1917, 1936, 1962). Pînă în prezent au fost folosite trei tipuri de antigene artificiale: 1) conjugate haptenă—proteine; 2) conjugate proteină—proteină, obținute cu ajutorul unor agenți de legare bifuncționali ca diizocianații și carbodiimidele și 3) proteine legate de suportur. insolubile, de tipul derivaților celulozici (Sephadex, Sepharose etc.) Cercetările lui Landsteiner, de o importanță fundamentală, s-au bazat pe utilizarea conjugatelor diazohaptenă—proteine (azoproteine) obținute prin legarea unor amine aromatice de proteine, prin reacții de diazotare. După cuplarea cu tirozina, histidina sau lizina din structura proteinelor, antigenele artificiale produc trei categorii de anticorpi, după cum reacționează cu haptena, cu molecula-purtător sau cu complexul azoproteină (fig. 8).

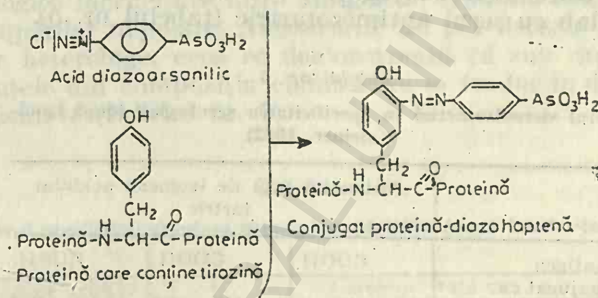


Fig. 8. — Formarea unui conjugat proteină — diazohaptenă, legînd covalent o sare de diazoniu de un rest de tirozină din proteină. Antigenele de acest tip produc trei categorii de anticorpi: 1) care reacționează numai cu haptena; 2) care reacționează numai cu purtătorul antigenului; 3) care reacționează cu complexul haptenă — proteină.

Cu ajutorul acestui model experimental a fost demonstrată influența următoarelor particularități de structură a antigenelor asupra specificității acestora, revelată prin reacții serologice antigen—anticorp:

1) *Influența aranjamentului spațial al moleculelor de antigen* a fost studiată utilizînd antigene conjugate, în care gruparea carboxil (—COOH) este legată în pozițiile orto-, meta- și para- pe ciclul benzenic al anilinei. Antiserurile produse cu fiecare din aceste azoproteine monospecifice au fost testate față de anilină ca atare și față de cele trei tipuri de compuși. Rezultatele demonstrează relația de strictă specificitate dintre tipul de antigen și antiserul corespunzător, fapt care evidențiază importanța configurației spațiale a haptenei în specificitatea serologică (tabelul nr. 4).

Tabelul nr. 4

Importanţa aranjamentului spaţial asupra specificităţii serologice (după Landsteiner, 1962)

Tipul de antigen	Antiseruri față de			
Antigen conjugat cu	Anilină (NH_2)	APOB (NH_2, COOH)	AMOB (NH_2, COOH)	APAB (NH_2, COOH)
Anilină	+++	-	-	-
Acid-o-aminobenzoic	-	+++	-	-
Acid-m-aminobenzoic	-	-	+++	-
Acid-p-aminobenzoic	-	-	-	+++

2) *Rolul stereoizomeriei în specificitate* a fost studiat cu ajutorul antigenelor conjugate cu acid D-tartric, L-tartric şi mezotartric (format din părţi egale de acizi D- şi L-tartric). Reacţiile serologice demonstrează importanţa stereoizomeriei, deoarece sînt pozitive intens numai cu antigenul omolog. Antigenele conjugate cu acid L- şi D-tartric reacţionează numai foarte slab cu serul antimezotartric (tabelul nr. 5).

Tabelul nr. 5

Rolul stereoizomeriei în specificitatea serologică (după Landsteiner, 1962)

	Antiseruri faţă de izomerii acidului tartric		
Antigen conjugat cu	COOH – HO–CH – HC–OH – COOH Dextro	COOH – HC–OH – HO–CH – COOH Levo	COOH – HC–OH – HC–OH – COOH Mezo
Dextro	+++	—	urme
Levo	—	+++	urme
Mezo	—	urme	+++

3) *Influenţa radicalilor acizi asupra specificităţii* a fost studiată cu ajutorul antigenelor conjugate cu anilină, acid para-aminobenzoic (APAB), acid para-aminobenzensulfonic (APAS) şi cu acid para-aminofenilarsonic (APAA). S-a demonstrat astfel că grupările polare au un rol important în structura şi funcţia determinantului antigenic, antigenitatea conferită proteinei fiind corelată cu sarcina electrostatică. Ca dovadă, acidul para-aminofenilarsonic, care are două sarcini negative ($A_3O_3^{2-}$), este mai activ decît APAB şi APAS, care au numai cîte una (COO^- şi respectiv SO_3^-) (tabelul nr. 6).

Tabelul nr. 6

Influenţa radicalilor acizi asupra specificităţii serologice (după Landsteiner, 1962)

Tipul de antigen	Antiseruri faţă de			
Antigen conjugat cu	NH_2 Anilină	NH_2 COCH APAB	NH_2 SO_3H APAS	NH_2 $AsSO_3H_2$ APAA
Anilină	+++	–	–	–
APAB	–	+++	–	–
APAS	–	–	+++±	–
APAA	–	–	–	+++±

4) *Efectul grupărilor nepolare asupra specificităţii* a fost studiat prin reacţii de precipitare încrucişate între antigene preparate din proteine serice de găină, conjugate cu diferite amine aromatice, ca para-toluidina, para-cloranilina, para-iodanilina ş.a. Prezenţa a numeroase reacţii serologice încrucişate între antigenele studiate demonstrează rolul minor al grupărilor nepolare. Antiserurile nu pot deosebi haptenele omologe de cele heterologe, ceea ce demonstrează că sub raportul specificităţii diferenţele din compoziţia chimică nu se traduc în diferenţe antigenice semnificative (tabelul nr. 7).

Tabelul nr. 7

Efectul grupărilor nepolare asupra specificităţii (după Landsteiner, 1962)

Tipul de antigen	Antiseruri faţă de			
Antigen conjugat cu	NH_2 Anilină	NH_2 CH_3 p-toluidină	NH_2 Cl p-cloranilină	NH_2 I p-iodanilină
Anilină	++±	+±	++±	+±
p-toluidină	++	++	++	++
p-cloranilină	++±	++	++	++
p-iodanilină	+±	++	++	++

5) *Rolul legăturilor glicozidice în specificitatea serologică* a fost studiat cu ajutorul antigenelor proteice, conjugate cu p-aminofenil-α-glucozide(PAF α Glu), cu p-aminofenol-β-glucozide (PAE β Glu) şi cu p-aminofenil-β-galactozide (PAF β Gal) (tabelul nr. 8). Experienţele demonstrează că reacţiile încrucişate între α- şi β-glicozide, deşi prezente, pot diferenţia cele două tipuri de antigene datorită titrului lor evident inferior celui al reacţiilor omologe. De asemenea, este evident că orientarea grupărilor hidroxil pe unitatea monozaharidică este deosebit de importantă pentru specificitate. Antiserurile deosebesc uşor glucoza de

galactoză, deşi acestea diferă numai prin orientarea atomului de H şi a grupării OH pe atomul de C_4. Ca urmare, β-galactozidele nu reacţionează încrucişat cu β-glucozidele.

Tabelul nr. 8

Rolul legăturilor glicozidice în specificitatea serologică

Tipul de antigen	Antiseruri faţă de		
Antigene conjugate cu	PAFαGlu	PAFβGlu	PAFβGal
PAFαGlu	+++	+	–
PAFβGlu	++	++++	–
PAFβGal	–	–	+++

6) *Importanţa grupărilor chimice terminale* a fost studiată prin cuplarea de structura antigenului a unor scurte peptide, cu secvenţă cunoscută, de regulă dipeptide sau tripeptide. S-a demonstrat astfel că anticorpii faţă de un antigen de tipul glicil-leucil-proteină nu reacţionează cu cei produşi faţă de antigenul leucil-glicil-proteină şi invers. Concluzia este că grupările terminale ale determinanţilor antigenici sînt importante pentru specificitatea acestora, dar că nu reprezintă în mod obligatoriu factorul cel mai important.

Factorii care condiţionează imunogenitatea

Cercetările referitoare la structura chimică a antigenelor şi la condiţiile care controlează activitatea lor sînt supuse unor dificultăţi proprii domeniului (posibilitatea unei substanţe neantigenice *per se* de a deveni antigenică după cuplare *in vivo* cu una din moleculele proprii animalului-test, relativa insensibilitate a reacţiilor utilizate curent etc.).

Alături de rezultatele cercetărilor lui Landsteiner asupra antigenelor artificiale, cunoştinţele referitoare la structura fizico-chimică şi funcţiile antigenelor sînt dominate de lucrările devenite clasice ale lui Sela, precum şi ale lui Sela şi Arnon, începute în anul 1960, asupra antigenelor sintetice. S-a demonstrat că polimerii sintetici lineari sau ramificaţi compuşi exclusiv din aminoacizi uniţi prin legături peptidice se comportă ca antigene foarte specifice şi puternice pentru om, cobai, iepure, şoarece, şobolan etc. Introducerea deliberată a unor modificări structurale, în compoziţia polimerilor de bază, a permis obţinerea unor

cunoştinţe aprofundate asupra unor proprietăţi esenţiale implicate în imunogeneză, precum sînt cele legate de mărimea, forma, compoziţia chimică, localizarea determinanţilor antigenici, în raport cu restul moleculei de antigen, rolul configuraţiei optice, al sarcinii electrice, conformaţiei sterice etc. De asemenea, aceste cercetări au permis concretizarea conceptelor de imunopotenţă, imunodominanţă, aprecierea mărimii şi a raporturilor dintre determinanţii antigenici şi situsul de combinare al anticorpilor etc., permiţînd, în momentul de faţă, chiar unele generalizări privind factorii care condiţionează imunogenitatea.

1) **Caracterul „străin".** Gradul de imunogenitate al unei molecule depinde de măsura în care diferă de componenţii omologi ai gazdei. În general, o substanţă cu cît este mai străină cu atît este mai imunogenă. Proteinele vegetale, spre exemplu, sînt antigene foarte bune pentru orice animal. În condiţii normale, constituenţii proprii (autologi), deşi sînt antigenici pentru alte specii, sînt toleraţi perfect şi nu sînt imunogeni pentru propria lor gazdă. Ei pot deveni „străini" pentru propriul organism dacă suferă modificări induse de infecţii, medicamente, substanţe chimice, agenţi fizici etc. De asemenea, pot fi recunoscute ca străine anumite molecule proprii segregate anatomic, normal aflate la adăpost de celulele sistemului imunitar, dacă sînt eliberate in circulaţie. În această categorie de antigene „sechestrate" intră cazeina din lapte, unele proteine spermatice, proteinele din cristalin ş.a. Caracterul de propriu şi străin a fost sesizat de Ehrlich (1885), pe baza observaţiei că organismul tolerează perfect moleculele proprii normale („Horror autotoxicus"). Producerea de anticorpi faţă de ele ar fi incompatibilă cu viaţa, deoarece complexele antigen—anticorp formate ar distruge şi elimina propriile celule.

Organismul dispune chiar de sisteme protectoare care minimalizează producerea de anticorpi faţă de antigenele normale circulatorii. Burnet şi Fenner (1949) au arătat caracterul general al acestui proces şi au formulat un cadru conceptual larg, care stă la baza imunologiei moderne, privind recunoaşterea substanţelor proprii („self") şi deosebirea lor de cele străine („nonself"). Caracterul „nonself" (străin) nu implică prezenţa unor molecule originale, neîntîlnite în alte organisme, ci foarte adesea este dat de modificări minime, rezultînd din prezenţa unui aminoacid diferit, într-o poziţie anumită în structura unei proteine, altfel similară sau chiar identică, sau existenţa unui aranjament spaţial al aminoacizilor diferit de cel din proteinele proprii. În acest context, este de remarcat faptul că, în general, proteinele care apar mai timpuriu în ontogenia vertebratelor sînt mai slab imunogene pentru speciile strîns înrudite decît cele apărute mai tîrziu. Ca urmare, există un grad mai mare de omologie pentru serumalbumine, între speciile strîns înrudite de vertebrate, decît pentru serumglobuline (Boyden, 1958). De asemenea, moleculele care îndeplinesc funcţii similare la diferite specii (insulina, hemoglobina, tiroglobulina etc.), fiind structural asemănătoare, sînt slab imunogene pentru un spectru larg de gazde taxonomic diferite.

2) **Mărimea moleculei.** Deşi după Barrett (1976) nu există o limită inferioară specifică de greutate moleculară pentru antigenitate, antigenele „bune" au o g.m. > de 10 000 dal. În general, cu cît greutatea moleculară

este mai mare cu atît diferitele substanţe sînt mai imunogene (tabelul nr. 9). Aceasta s-ar datora faptului că numărul determinanţilor antigenici este mai mare, deoarece în proteinele naturale aceeaşi secvenţă de aminoacizi sau acelaşi tip de pliere s-ar repeta rar în diferitele părţi ale moleculei.

Tabelul nr. 9

Gradul relativ al antigenităţii unor compuşi, în funcţie de greutatea lor moleculară (după Absolom, 1986)

Compuşii	Greutatea moleculară (dal)	Antigenitatea relativă
Aminoacizi	$\leqslant 1\times10^2$	Nulă
Acizi graşi	$\leqslant 2\times10^2$	Nulă
Purine şi pirimidine	$\leqslant 2\times10^2$	Nulă
Monozaharide	$\leqslant 2\times10^2$	Nulă
Lanţul α al insulinei	$2,5\times10^3$	Slabă
Lanţul β al insulinei	$2,5\times10^3$	Slabă
Glucagon	$3,6\times10^3$	Slabă
Serumalbumină	$6,9\times10^4$	Puternică
Globuline	$1,5\times10^5$	Puternică
Hemocianine	$6-8\times10^6$	Foarte puternică
Virusuri (v. mozaicului tutunului)	7×10^7	Foarte puternică

Proteinele cu g.m. mari ca ovalbumina (~ 40 000 dal), serumalbumina (~ 70 000 dal) sau hemocianina (6×10^6 dal) sînt foarte bune imunogene. Substanţele cu greutăţi moleculare mici ca insulina (~ 5 700 dal), proteinele şi histonele (~ 6 000 dal) sau glucagonul (3 485 dal) sînt mai puţin active ca imunogene. La greutăţi şi mai mici, substanţele antigenice sînt din ce în ce mai rare (spre exemplu, vasopresina are ~1 000 dal). Cele mai multe polipeptide sintetice sînt antigenice dacă au g.m. de ~ 4 000 — — 5 000 dal, sau chiar mai mici, dacă posedă caracteristicile necesare pentru imunogenitate. Astfel, α-dinitrofenilhepta-L-lizina (g.m. ~1 080 dal) este imunogenă pentru cobai (nu însă şi pentru iepure), în timp ce α-dinitrofenilhexa-L-lizina este neimunogenă pentru ambele specii (Schlossman şi colab., 1967). Unele molecule slab antigenice sau aparent neantigenice pot deveni imunogene relativ bune dacă sînt asociate cu adjuvanţi care stimulează producerea de anticorpi. Hormonul gastrina (stimulator al acidităţii gastrice), neantigenic ca atare (~ 2 200 dal), devine antigenic dacă este legat de molecule de polimetilmetacrilat (Strample şi colab., 1967). În general, la greutăţi moleculare egale polizaharidele naturale, alcătuite dintr-un număr mic de monoglucide diferite sînt anti-

gene mai slabe decît proteinele care au o diversitate mult mai mare de monomeri. Aceasta explică de ce dextranii produc răspuns imun numai de la greutăți moleculare superioare celei de 50 000 — 100 000 dal și cu variații foarte mari de la o specie la alta (omul și șoarecii răspund relativ bine, în timp ce cobaii răspund foarte slab).

3) **Complexitatea moleculară.** Simpla mărime a moleculei nu este suficientă pentru a conferi calitatea de antigen. Dovada o constituie faptul că polimerii macromoleculari de tipul poliacrilamidei, nylonului etc., alcătuiți dintr-un număr mare de monomeri legați într-o structură repetitivă, nu sînt antigenici, deși au o g.m. mare. Homopolimerii sintetici, spre exemplu, alcătuiți dintr-un singur aminoacid, nu sînt în mod obișnuit imunogeni, cu foarte rare excepții, ca, de exemplu, poli-L-prolina, poli-L-glutamic, care pot fi slab antigenici pentru anumite linii genetice de cobai. Copolimerii alcătuiți din doi aminoacizi diferiți pot imuniza iepurii, dar nu și omul sau șoarecii.

Polipeptidele formate din 3 — 4 aminoacizi sînt imunogene pentru toate speciile, fapt care demonstrează necesitatea existenței unui anumit grad minim de complexitate chimică (Maurer și Pinchuck, 1968). Complexitatea moleculară nu depinde numai de diversitatea monomerilor, ci și de secvența lor și de efectul acesteia asupra structurii secundare, terțiare și chiar cuaternare. Aceasta explică marea imunogenitate a proteinelor naturale (alcătuite din 18 — 20 de aminoacizi și cu o conformație spațială caracteristică), în comparație cu polizaharidele naturale (slab antigenice) și mai ales cu lipidele și acizii nucleici, practic neantigenici.

4) **Rolul stării fizice a antigenelor.** Studiile efectuate cu ajutorul polimerilor sintetici (Sela, 1960, 1969; Arnon și Sela, 1983, 1985) au evidențiat și importanța unor particularități fizice ale antigenelor.

Importanța rigidității moleculelor. Haurowitz (1952, 1954) consideră că antigenitatea este condiționată de o anumită rigiditate a structurii determinanților. Lipsa acesteia ar explica slaba imunogenitate a gelatinei, proteină denaturată, bogată în glicocol, derivată din hidroliza colagenului. Avînd foarte puțină histidină și tirozină, lipsită de cisteină și triptofan, molecula de gelatină nu are o configurație fixă și se rotește în jurul axului său longitudinal.

Sela (1960, 1969) a demonstrat că legarea de L-tirozină în proporție de 2% îi mărește imunogenitatea și determină producerea de anticorpi, care reacționează cu gelatina nativă. În acest caz, tirozina se comportă ca un stimulator, deoarece face din molecula de gelatină un imunogen mai bun, fără a-i modifica mult specificitatea. Legarea unei cantități mai mari de tirozină (10%) face gelatina un antigen foarte bun, iar anticorpii produși se leagă specific de polipeptidele de L-tirozină, gelatina comportîndu-se ca un simplu „purtător". Aceste date sînt interpretate ca rezultat al creșterii rigidității sau inflexibilității moleculei de gelatină.

Creșterea imunogenității gelatinei s-a obținut și prin legarea de poli-L-triptofan și poli-L-fenilalanină, în timp ce legarea de homopolimeri de L-alanină, acid glutamic, serină, lizină sau prolină rămîne fără efect.

Rolul sarcinii electrice este contradictoriu. Sela şi Fuchs (1963), lucrînd cu un polimer sintetic ramificat, bogat în tirozină, solubil în apă şi neionizabil la pH neutru, au arătat că prezenţa unor sarcini electrice pe macromoleculă nu este obligatorie pentru imunogenitate. În acelaşi sens pledează şi observaţia că dextranul, deşi este complet neionizat, este imunogen. Cu toate acestea, cele mai multe molecule naturale sînt încărcate şi sarcina lor electrică pare să contribuie la imunogenitatea moleculelor în care se găsesc. Goodman (1984) consideră că acest efect ar putea fi rezultatul unei interdependenţe între sarcina electrică şi accesibilitate, în sensul că grupările încărcate, hidrofile, sînt în contact mai strîns cu mediul decît cele nepolare supuse unor restricţii conformaţionale.

Solubilitatea. Necesitatea ca substanţele imunogene să fie solubile sau solubilizabile este susţinută de o serie de fapte de observaţie: 1) lipsa de antigenitate a polimerilor macromoleculari de sinteză este dată de insolubilitatea lor în organism şi de imposibilitatea convertirii lor la forme solubile pe cale enzimatică; 2) polizaharidele din *Streptococcus pneumoniae* sînt mult mai imunogene pentru şoarece, datorită activităţii hidrolitice intense a enzimelor din ficatul acestuia, decît pentru iepure; 3) imunogenitatea slabă a copolimerilor de D-aminoacizi nenaturali este o consecinţă a degradării lor dificile şi lente.

Solubilitatea imunogenelor nu este o precondiţie obligatorie pătrunderii lor în organism. În foarte multe cazuri, cum s-a demonstrat pentru antigenele corpusculare (virusuri, bacterii, alte tipuri de celule), solubilizarea şi eliberarea constituenţilor imunogeni are loc după înglobarea lor de către macrofage, în care suferă un proces de degradare menajată şi de pregătire, înainte de a fi „prezentate" celulelor limfoide.

Rolul configuraţiei optice a aminoacizilor. Spre deosebire de copolimerii sintetici de L-aminoacizi, care sînt imunogeni buni, chiar în doze foarte mici, peptidele sintetice formate exclusiv din D-aminoacizi sînt foarte slab imunogene. Ceva mai mult, imunogenitatea lor este riguros dependentă de doză (Stupp şi Sela, 1967). Astfel, polimerii obţinuţi prin legarea unor peptide scurte de D-tirozină şi D-acid glutamic sau de D-fenilalanină şi D-acid glutamic de o structură multicatenară de poli-D-prolină sînt complet neimunogeni pentru iepure cînd sînt folosiţi în doză mare şi slab imunogeni cînd imunizarea este făcută cu o doză mică (Sela, 1969). Un alt exemplu este legat de răspunsul şoarecelui la D-izomeri, care este condiţionat de injectarea unui microgram/şoarece, în timp ce cel faţă de L-izomeri este independent de doză. Janeway Jr. şi Humphrey (1969) consideră că incapacitatea polimerilor compuşi exclusiv din D-aminoacizi de a induce un răspuns imun ar fi dată de catabolismul lor lent şi incomplet. Legarea unei cantităţi mici (8,5%) de L-aminoacizi pe suprafaţa unei macromolecule constituite exclusiv din D-aminoacizi o converteşte într-un bun antigen. În acest caz, peptidele scurte alcătuite din L-aminoacizi reprezintă adevăraţi determinanţi de specificitate, a căror solubilizare nu depinde de catabolismul lent al poli-D-aminoacizilor (Sela, 1969). În schimb, o macromoleculă care conţine pînă la 95,5% L-prolină şi L-lizină, dar are toate catenele laterale terminate cu D-aminoacizi, este un imunogen foarte slab, asemănător unei macromolecule compuse exclusiv din D-aminoacizi. Este de asemenea important de reţinut

faptul că anticorpii sînt stereospecifici (Landsteiner, 1945). Datorită acestui fapt ei sînt riguros specifici, iar reacțiile încrucișate dintre anticorpii produși față de un determinant de tip poli-L-aminoacid cu un determinant poli-D-aminoacid sînt totdeauna absente.

Accesibilitatea determinanților antigenici. Studiile lui Sela (1960, 1969), precum și ale lui Arnon și Sela (1967, 1983) demonstrează că zonele imunologic importante trebuie să fie situate la suprafața moleculei și accesibile celulelor sistemului imunitar. Sela a demonstrat că polimerul sintetic de tip multi-poli-DL-alanil-poli-L-lizină obținut prin legarea unor lanțuri laterale de DL-alanină de grupările amino ale unui schelet de poli-L-lizină este neantigenic pentru iepure *. În construirea lui a preferat polimerul de DL-alanină celui de L-alanină, care este foarte insolubil în apă. După legarea unor resturi de tirozină sau tirozină și acid glutamic de polimerul neantigenic, acesta devine un antigen puternic și specific, capabil să producă anticorpi foarte specifici după injectare la iepure (fig. 9). El a preparat apoi o moleculă cu aceeași mărime, formă și compoziție, legînd tirozina și acidul glutamic direct de scheletul de polilizină, obținînd de asemenea un antigen sintetic foarte bun. Dacă de tirozină și de acidul glutamic se leagă polipeptide de alanină, spre exteriorul moleculei polimerul multicatenar devine neantigenic pentru iepure.

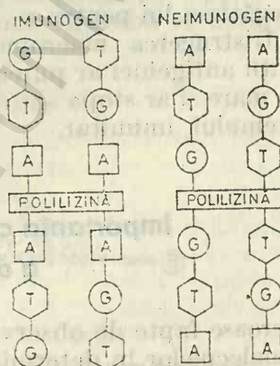


Fig. 9. — Antigene sintetice. Copolimer multicatenar în care L-tirozina și acidul L-glutamic sînt legați de multi-poli-DL-alanil-poli-L-lizina (poli- [Tyr, Glu] -poli-DL-Ala-poli-Lys) (stg). Copolimer în care tirozina și acidul glutamic sînt legați direct de scheletul de polilizină cu peptidele de alanină la capetele catenelor laterale (dr.) (după Sela, 1969).

Din aceste date se pot trage mai multe concluzii importante:

1) polimerii multicatenari cu densități diferite de catene laterale, ca și polipeptidele lineare pot fi imunogeni. Forma globală a moleculei nu pare să fie un factor critic în imunogeneză;

2) pentru a asigura producerea de anticorpi, suprafețele importante din punct de vedere imunologic trebuie să fie ușor accesibile și nu „ascunse" în interiorul moleculei;

---

* Sela (1969) precizează că detectarea anticorpilor sau reacțiilor imunității mediate celular, după administrarea unei substanțe, permit considerarea ei — fără echivoc — ca imunogen. În schimb, caracterul de „neimunogen" al unui compus este pur operațional și poate fi definit numai în funcție de metodele de imunizare și de detectare. Datorită acestui fapt, în condiții speciale, chiar polimerul multicatenar de DL-alanină poate determina producerea de anticorpi (Rimon, Sela și colab., 1967).

3) prin modificare chimică, substanţele antigenice pot deveni neantigenice, în timp ce materialele neantigenice pot deveni imunogene bune şi specifice;

4) După Sela, ipoteza susţinută de unii imunologi, care consideră sensibilitatea macromoleculelor la acţiunea enzimelor hidrolitice ca o precondiţie obligatorie pentru funcţia lor de antigene, nu are o bază experimentală univocă. Atît experienţele cu antigene naturale, cît şi cele cu antigene sintetice pledează pentru ideea că în momentul administrării lui, ca şi în cel al „recunoaşterii" de către celulele sistemului imunitar, determinanţii antigenici sînt intacţi sau în orice caz nemodificaţi de degradări semnificative. Faptul că în antigenele sintetice cu structură perfect cunoscută zonele „ascunse" în interiorul moleculelor sînt neimunogene sau foarte greu imunogene, în timp ce zonele similare expuse pe suprafaţa externă a moleculelor sînt foarte imunogene pledează pentru această idee. Dacă imunogenele ar fi prelucrate şi degradate la molecule mici înainte de etapa de recunoaştere, zonele „ascunse" ar avea foarte multe şanse să fie revelate şi să se comporte ca imunogene. Degradarea proteolitică, cu rol esenţial în declanşarea răspunsului imun, are loc după ce determinantul antigenic a fost recunoscut. În cazul antigenelor corpusculare (virusuri, bacterii, alte tipuri de celule etc.), acest proces are loc după înglobarea lor în macrofage, în care are loc „prelucrarea" antigenului şi pregătirea lui pentru o „prezentare" eficientă celulelor sistemului imunitar. Distrugerea macromoleculelor imunogene sau a unora din determinanţii antigenici ar putea fi necesară doar cînd excesul de antigen ar fi foarte mare şi ar stopa sinteza anticorpilor printr-un proces de copleşire a sistemului imunitar.

Importanţa conformaţiei spaţiale a antigenului

Numeroase fapte de observaţie au sugerat rolul important al plierii spaţiale a moleculelor în determinarea specificităţii lor antigenice. Există o serie de exemple, care arată că proteinele denaturate reacţionează slab sau chiar deloc cu anticorpii produşi faţă de forma lor nativă, normală. Astfel, anticorpii faţă de ribonucleaza bovină nu reacţionează cu aceeaşi enzimă oxidată cu acid performic, care se prezintă ca un lanţ polipeptidic răsucit aleatoriu, din cauza lipsei legăturilor S—S. Invers, anticorpii produşi de ribonucleaza oxidată nu reacţionează cu enzima nativă (Neumann şi colab., 1967). În mod similar, anticorpii produşi pe capră faţă de IgG de iepure nu reacţionează cu aceasta dacă în prealabil legăturile S—S au fost desfăcute prin reducere cu 2-mercaptoetanol (Seligman, Mihaesco şi Metshaka, 1966). În ambele cazuri, modificările în conformaţia proteinelor determină pierderea determinanţilor antigenici originari. Sela (1969) precizează că în acest context termenul de conformaţie implică o aranjare particulară a poziţiei atomilor unei molecule, care poate fi dobîndită fără o reorganizare a legăturilor chimice. S-a mai demonstrat că proteinele cuplate cu glicozide izomere produc anticorpi care deose-

besc glucoza de galactoză în reacţii de precipitare, deşi ele sînt diferite numai prin orientarea H şi OH de la atomul de C_4. În mod similar, este deosebit p-aminofenil-α-glucozidul de p-aminofenil-β-glucozidul corespunzător, deşi au o compoziţie chimică identică, dar diferă stereochimic. Concluzia acestor observaţii şi a încă multor altora este că, în unele cazuri, anticorpii recunosc mai degrabă forma tridimensională globală a unui determinant antigenic, decît o anumită secvenţă chimică specifică din structura lor.

Pentru a elucida rolul conformaţiei antigenului în imunogenitate şi specificitate, Sela (1969) a studiat răspunsul imun faţă de două peptide sintetice avînd determinanţi antigenici cu aceeaşi compoziţie chimică, dar cu conformaţii diferite. În primul caz, determinanţii reprezentaţi de tripeptidul Tyr-Ala-Glu au fost incluşi într-un polimer sintetic ramificat multicatenar, prin legare de grupările aminoterminale ale lanţurilor laterale ale unui polimer multi-poli-DL-alanil-poli-L-lizină, pentru a le conferi greutatea moleculară (~ 75 000 dal) necesară pentru a deveni un bun imunogen. Injectat la iepure, acest polimer stimulează producerea de anticorpi specifici pentru tripeptid (fig. 10 A). Dacă acelaşi tripeptid este polimerizat de un număr mare de ori, pentru a obţine un polimer periodic cu structura (Tyr-Ala-Glu) n, cu g.m. ~ 100 000 dal, acesta ia o formă spaţială specifică de α-helix. Injectat la iepure, stimulează producerea de anticorpi care recunosc mai degrabă structura specifică spaţială decît tripeptidul.

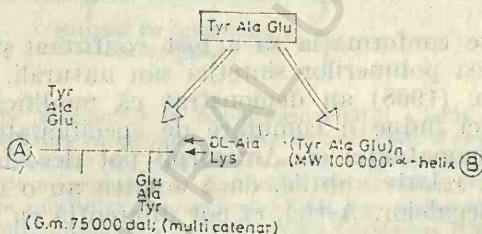


Fig. 10. — Antigene sintetice. A. Polimer sintetic ramificat, în care peptidele cu secvenţa Tyr-Ala-Glu sînt legate de grupările aminoterminale ale lanţurilor polimerice laterale în multi-poli-DL-alanil-poli-L-lizină, B. Polimer periodic, format din tripeptidul Tyr-Ala-Glu (după Sela, 1969).

Pe baza acestor date, Sela (1969) recunoaşte existenţa a două categorii de determinanţi antigenici :

1) *determinanţii secvenţiali*, a căror specificitate este dată de secvenţa subunităţilor componente (aminoacizi sau monoglucide), indiferent de structura lor spaţială. Anticorpii produşi de un astfel de determinant reacţionează cu orice peptid care are o secvenţă similară sau identică.

2) *determinanţii conformaţionali*, a căror specificitate derivă din conformaţia sterică a macromoleculei, determinată probabil de o anumită juxtapoziţie a aminoacizilor în conformaţia rigidă a moleculei. Anticorpii produşi nu reacţionează obligatoriu cu secvenţele peptidice derivate din acea zonă a moleculei (fig. 10 B). Faptul că elementul imunodominant

Tabelul nr. 10

Structura unor determinanți antigenici secvențiali (după Goodman, 1984)

Antigenul	Specia	Determinantul antigenic
Dextran	Om	Izomaltohexoză
Dextran	Iepure	≥ Izomaltohexoză
Acid poli-γ-glutamic	Iepure	Acid hexaglutamic
Polialanil-serumalbumină bovină	Iepure	Pentaalanină
Polilizil-serumalbumină de iepure	Iepure	Penta- sau hexalizină
α-Dinitrofenil-(lizină)11	Cobai	α-Dinitrofenil-heptalizină
α-Dinitrofenil- polilizină	Cobai	α-Dinitrofenil-trilizină
(D-Ala)n-Gly-RNază	Iepure	Tetrapeptid
ADN denaturat	Om	Pentanucleotid

al polimerului este conformația sa a fost confirmat și de alte cercetări, bazate pe utilizarea polimerilor sintetici sau naturali.

Gill și colab. (1968) au demonstrat că modificările conformației polimerilor sintetici induc o comutare de specificitate și o modificare importantă a imunopotenței ei. Anticorpii pot deosebi diferite tipuri de modificări chimice relativ subtile, dacă acestea au o influență marcată asupra formei moleculelor. Astfel, ei pot diferenția cu mare sensibilitate fericitocromul *c* de ferocitocromul *c*, oxihemoglobina de dezoxihemoglobină, oximioglobina de dezoximioglobină etc. Studiile asupra mioglobinei din sperma de balenă par să sugereze că în structura spațială a acesteia „colțurile" moleculei create de prezența unor resturi de prolină sau de hidroxiprolină sînt frecvent situsuri determinante de antigenitate, care, proeminînd din profilul general al lanțului peptidic, par să fie situsuri privilegiate de recunoaștere pentru sistemul imunitar. Este probabil că aceste configurații ar fi mult mai rezistente la digestia enzimatică completă și ar funcționa ca determinanți antigenici mai ușor conservați. Faptul că anticorpii produși față de o proteină globulară întreagă se leagă numai de scurte regiuni din structura ei nu reprezintă un argument împotriva rolului jucat de structura primară și cea secundară în specificitate.

În sfîrșit, importanța determinanților dependenți de conformație a fost evidențiată de Arnon și Sela (1970), prin studiul unei proteine native cum este lizozimul din albușul oului de găină. Stabilirea secvenței aminoacizilor a permis stabilirea existenței unei regiuni corespunzînd unei „bucle"

peptidice, care include aminoacizii din pozițiile 64 —83, formată prin închiderea secvenței respective de o legătură S—S între două resturi de cisteină (vezi fig. 7). Această „buclă" a fost sintetizată chimic și legată de polimerul multi-poli-DL-alanil-poli-L-lizină. Injectat la iepure produce anticorpi care reacționează exclusiv cu această regiune unică, avînd funcția de determinant conformațional în proteina nativă.

În general, se poate considera că anticorpii produși de proteinele naturale sînt dirijați mai ales față de determinanții conformaționali și numai rar față de cei secvențiali. Demonstrarea existenței determinanților conformaționali în structura proteinelor globulare explică și mecanismul de legare antigen—anticorp bazat pe complementaritatea structurală dintre ele de tip „lacăt și cheie" („lock and key") (fig. 11). După acest mecanism, determinantul antigenic este constituit din subunități discrete, cărora le corespund subsitusuri cu conformație complementară în structura situsului de combinare al anticorpilor. Afinitatea de legare în cursul reacțiilor antigen — anticorp este direct proporțională cu gradul de „potrivire" dintre cele două entități.

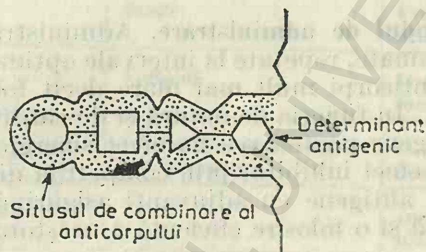


Fig. 11. — Reprezentare schematică (a complementarității „lacăt — cheie" între o grupare determinantă de specificitate a antigenului și situsul de combinare al anticorpului corespunzător. Determinantul poate fi format din subunități distincte reprezentate de cîțiva aminoacizi în cazul unui peptid sau de monoglucide în cazul catenelor glucidice. Situsul de combinare este format din mai multe subsitusuri, fiecare capabil să lege o anumită subunitate distinctă a determinantului antigenic (după Goodman, 1984).

Metabolizarea antigenelor controlează cantitatea de antigen intact și parțial degradat, capabil să stimuleze producerea de anticorpi. Felton (1949) a arătat că în timp ce o cantitate mică (0,5 μg) de polizaharid din *Streptococcus pneumoniae* este imunogen pentru șoarece, dozele 0,5 — 5 mg blochează orice răspuns imun pentru cîteva luni. Fenomenul este numit „paralizie imunologică". El ar fi datorit faptului că, spre deosebire de antigenele „bune", care după recunoaștere sînt rapid degradate parțial pentru a fi „prezentate" celulelor B în cantități optime, în vederea stimulării anticorpogenezei, polizaharidele pneumococice rămîn intacte în concentrații mari. După Sela (1966), în organism ar exista pentru fiecare antigen un echilibru între stimulare și paralizie, controlat genetic, de care ar depinde răspunsul imun. Gill și colab. (1967) generalizează observațiile lor asupra acestui proces admițînd că, în general, antigenele „bune" sînt rapid degradate menajat și stimulează anticorpogeneza, în timp ce antigenele „rele" induc paralizie imunologică, deoarece rezistă acestui proces.

Cantitatea de antigen injectat influenţează natura şi cantitatea anticorpilor produşi. Doza minimă imunogenă (capabilă să inducă producerea de anticorpi) variază în funcţie de natura antigenului şi de specia animală. La rozătoare, în general, este de 10^{-4} g pentru serumalbumina bovină, de 4 μg pentru polimerul sintetic poli(Tyr-Glu)-poli-DL-Ala-polilizină (iepure) şi de 10^{-14} pentru endotoxine. Dozele mici de antigene induc formarea unei cantităţi mici de anticorpi, care au însă o mare afinitate şi o mare specificitate pentru antigene. Dozele foarte mici stimulează preferenţial celulele T, inducînd imunitate mediată celular şi memorie imunologică evidentă chiar cu doze care nu stimulează producerea unor cantităţi decelabile de anticorpi (J. F. Bach, 1976).

Calea de administrare are o mare importanţă asupra răspunsului imun. În general, calea parenterală este de preferat, datorită faptului că oferă avantajele contactului rapid cu celulele imunocompetente din ganglionii limfatici regionali (după injecţia intradermică, subcutanată sau intramusculară) sau cu cele din splină (după injecţia intravenoasă), precum şi pe cele de protecţie faţă de degradarea enzimatică întîlnită frecvent în cazul administrării orale a antigenelor.

Ritmul şi modul de administrare. Administrarea antigenelor sub formă de doze fracţionate, repetate la intervale optime, asigură producerea unei cantităţi de anticorpi mult mai mare decît folosirea aceleiaşi doze într-o injecţie unică. În funcţie de natură şi de cantitate, asocierea a două sau mai multe antigene poate avea un efect sinergic în cursul imunizării sau, din contră, un efect inhibitor prin competiţia dintre antigene. Administrarea diferitelor antigene cu adjuvanţi asigurînd o stimulare antigenică de lungă durată şi o folosire eficientă a acestora asigură o imunogenitate superioară.

Rolul factorilor genetici este complex. În primul rînd este demonstrat că răspunsul imun faţă de un antigen variază în funcţie de specie. Polizaharidele capsulare de pneumococ înalt purificate sînt imunogene la om şi la şoarece, dar sînt fără efect pentru cobai şi iepure, care răspund numai la injectarea de celule bacteriene integrale. Spre deosebire de cobai, şoarecii fac relativ greu fenomenul de hipersensibilitate întîrziată. Studiul răspunsului imun al unor linii genetic pure „inbred" de şoarece faţă de antigene sintetice de tipul poliaminoacizilor a demonstrat de asemenea o comportare diferenţiată: şoarecii din liniile C3H şi BALB/c răspund cu producere de anticorpi după injecţia unui polimer de Glu-Lys-Ala, indiferent de proporţia aminoacizilor respectivi. În schimb, şoarecii aparţinînd liniilor CBA sau C57B1/6 răspund numai cînd cantitatea de alanină creşte la 10% din polimer. Răspunsul imun este diferit chiar în cadrul aceleiaşi specii. Unele animale sînt mai uşor de imunizat, în timp ce altele reacţionează slab sau sînt chiar refractare. Factorii genetici nu intervin numai în determinismul structurii Ig sau în procesul de recunoaştere a antigenelor, ci şi în reglarea propriu-zisă a anticorpogenezei, exercitînd un control global asupra răspunsului imun, asupra unei producţii „bune" sau „rele" de anticorpi. Tabelul nr. 11 prezintă sintetic influenţa unor caracteristici moleculare ale antigenelor asupra imunogenităţii lor.

Tabelul nr. 11

Unele caracteristici moleculare generale care afectează antigenitatea (după Absolom, 1986)

Proprietatea	Efectul asupra antigenităţii	Exemple
Dimensiunea Mică ⩽ 3 000 dal Mare ⩾ 1 × 10⁶dal	Scade Variabilă Creşte	Angiotensină Insulină Virusuri
Forma globală	Nul	Proteine globulare şi fibrilare
Forma grupării determinante de specificitate	Creşte	Peptide din acizi aromatici
Sarcina Mică sau medie	Nul	
Mare	Scade	Protamine, histone, acizi sialici
Prezenţa tirozinei	Variabil	Dependent de alţi factori ai antigenului
Nemetabolizabil	Scade (din cauza inducţiei toleranţei)	Lanţuri peptidice de D-aminoacizi
Agregarea (structură particulată)	Creşte	Imunoglobuline, microorganisme
Accesibilitatea	Creşte	Polimeri sintetici
Caracterul „străin"	Creşte	Dependent de gradul de „străin"
Complexitatea	Creşte	Microorganisme, proteine, structuri primare/terţiare

Conceptul de imunon

Dintzis şi colab. (1976) şi-au propus să studieze proprietăţile moleculare ale unui „antigen ideal", capabil să determine proliferarea şi diferenţierea limfocitelor B şi să amorseze un răspuns imun primar. Teoretic, aceste antigene ar trebui să cumuleze următoarele proprietăţi :

1) să fie formate dintr-o moleculă-purtător legată de haptene, ale căror număr per moleculă şi distanţă medie una faţă de alta să poată fi uşor apreciate;

2) să fie nedegradabile de către organismul la care sînt inoculate;

3) greutatea moleculară şi lungimea moleculei să fie în limite convenabile ;

4) molecula să aibă o structură lineară, să fie flexibilă, hidrofilă şi capabilă să interacţioneze liber cu receptorii celulari de suprafaţă, indiferent de aranjamentul geometric pe care îl pot lua ;

5) răspunsul imun să necesite interacţiuni celulare cu complexitate minimă şi să fie relativ T-independent.

Autorii au ales ca „antigene ideale" o serie de lanţuri lineare de poliacrilamidă cu greutăţi moleculare variabile, substituite în diferite grade cu gruparea haptenică DNF (dinitrofenol). Injectarea polimerilor cu dimensiuni diferite la şoarece a demonstrat că apariţia răspunsului imun este condiţionată de o limită-prag netă: polimerii cu mai puţin de 12 — 16 grupări haptenice, spaţiate adecvat pe moleculă, sînt neimunogeni, în timp ce cei mai mari produc un răspuns imun puternic.

Concluzia este că apariţia unui răspuns imun este condiţionată de declanşarea unui număr suficient de semnale imunogene. Acest proces s-ar realiza prin conectarea într-un ansamblu („cluster"), grupat spaţial continuu — într-un imunon — a unui număr minim de 10 — 20 determinanţi antigenici (fig. 12). După Dintzis şi colab., acest concept ar reflecta şi numărul minim al determinanţilor antigenici necesari pentru declanşarea unui răspuns imun primar.

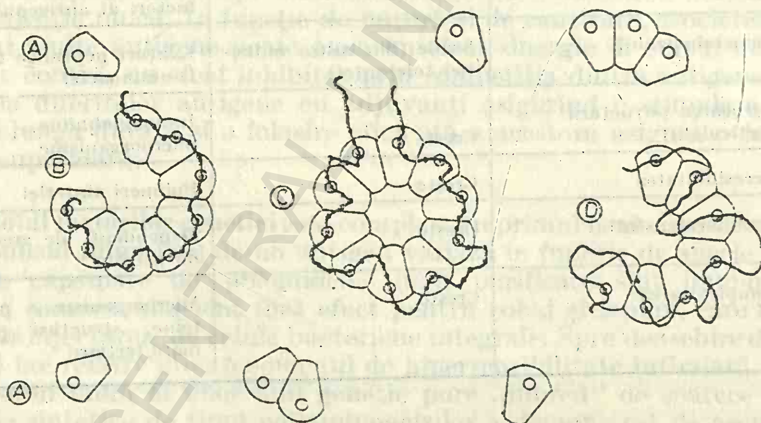


Fig.12. — Conceptul de imunon. A. Proteine-receptor care conţin un singur situs de legare (o). Liniile negre groase reprezintă molecule de poliacrilamidă cu grupări DNP substituite (o), cu lungimi şi număr de grupări DNP diferite (B, C, D). Numai figura C poate forma un imunon complet, datorită numărului adecvat de grupări DNP „eficiente", capabile să lege simultan situsurile receptoare ale unui imunon total. Figura prezintă proteine-receptor în diferite grade de agregare spontană. Un grad înalt de agregare implică formarea de legături stabilizatoare (după Dintzis, 1976).

Conceptul de haptenă

Landsteiner (1921) a demonstrat că în afară de moleculele antigenice care stimulează formarea de anticorpi, cu care pot interacţiona specific, vizibil *in vitro*, există o serie de substanţe care, deşi reacţionează cu anti-

corpii, nu sînt capabile să inducă un răspuns imun dacă sînt injectate la animale de laborator. El a propus denumirea de haptenă (gr. *haptein* — a apuca, a prinde) pentru a caracteriza orice substanță incapabilă *per se* să producă un răspuns imun, dar capabilă să servească drept imunogen, după cuplarea *in vivo* sau *in vitro* cu o moleculă-purtător („carrier"), care are obișnuit o greutate moleculară mare (fig. 13). Haptenele sînt deci neimunogene, dar au specificitate antigenică. De aici, denumirea veche de „jumătăți de antigene".

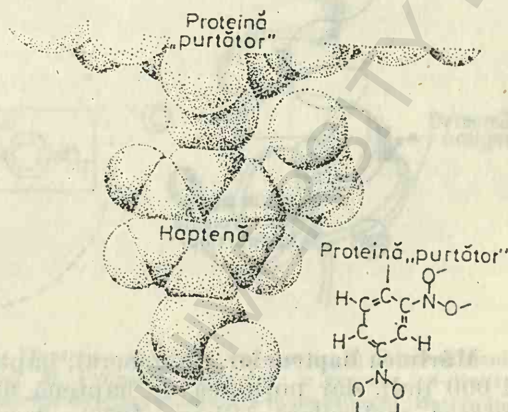


Fig. 13. — Reprezentare schematică tridimensională a unei haptene simple (gruparea dinitrofenil) legată de o proteină-„purtător" ipotetică (după Edelman, 1970).

Descoperirea lor este legată de observația că extractul alcoolic de rinichi de cal este neimunogen pentru iepure, dar se combină cu anticorpii produși de broiajul de rinichi normal. Extractul alcoolic induce sinteza anticorpilor, dacă este cuplat covalent cu o moleculă-„purtător". Cuplarea haptenelor cu purtătorii este condiționată de existența în structura lor a uneia sau mai multor grupări reactive, care le permit să se fixeze printr-o legătură covalentă de anumite grupări funcționale ale purtătorului, în condiții fizico-chimice ce mențin integritatea structurală a haptenei și pe cît posibil a purtătorului (J. F. Bach, 1974). Purtătorii utilizați cel mai frecvent sînt :

1) proteinele naturale (albumine, globuline), care au avantajul de a fi ușor de obținut, solubile, rezistente la denaturare și imunogene. În complexul realizat după cuplare („hapten-protein conjugate"), proteina are mai mulți determinanți naturali proprii („integrați"), iar haptena, spre exemplu molecula de 2,4-dinitrofenol (DNP), pe cei proprii (fig. 14). Conjugatele proteină — haptenă sînt imunogene : injectate la animale induc formarea de anticorpi care reacționează specific cu complexul imunogen, cu haptena simplă și cu determinanții antigenici ai purtătorului ;

2) purtătorii cu structură mai complexă, ca particulele fagice sau hematiile ;

3) copolimerii sintetici de aminoacizi, particule de agaroză (Sepharose 2B activată cu BrCn) etc.

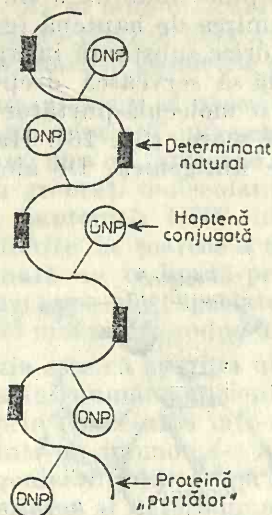


Fig. 14. — Reprezentare schematică a unui conjugat haptenă-proteină (după Werb şi Goodman, 1984). Proteina are mai mulţi determinanţi antigenici naturali sau integraţi (dreptunghiurile negre). Moleculele haptenei dinitrofenil (DNP) legate introduc noi determinanţi antigenici.

Mărimea haptenelor. În general, haptenele sînt molecule mici (g.m. $< 1\ 000$ dal), dar noţiunea de haptenă nu este corelată obligatoriu cu greutatea moleculară (Eisen, 1976), deoarece şi unele macromolecule pot funcţiona ca haptene. Goodman (1984) consideră că virtual orice entitate chimică poate servi ca haptenă, dacă este legată de un purtător imunogen adecvat. Au fost descrise două tipuri de haptene:

1) haptenele complexe, de tipul extractului alcoolic renal, care produc formarea de complexe antigen — anticorp insolubile, sub formă de precipitate vizibile;

2) haptenele simple reprezentate de molecule mici (alergene, polinucleotide), anumiţi compuşi chimici simpli (alcooli, formaldehidă etc.), care nu produc reacţii vizibile cu anticorpii.

Cunoaşterea proprietăţilor haptenelor a permis construcţia de antigene artificiale, cu ajutorul cărora au fost lămurite mai multe proprietăţi ale antigenelor, determinismul specificităţii imunologice, precum şi unele aspecte legate de structura anticorpilor şi de mecanismul formării lor.

Gruparea haptenică. Numeroase observaţii au demonstrat că, în unele cazuri, complementaritatea şi legarea anticorpilor cu haptenele este mai mare dacă acestea sînt asociate cu unul sau mai mulţi aminoacizi. Gruparea haptenică reprezintă deci o parte dintr-un determinant antigenic, care include, pe lîngă haptena propriu-zisă, şi cîteva resturi de aminoacizi de care este legată. În general, nu se poate aprecia cît din determinantul antigenic intră în structura grupării haptenice (fig. 15), dar se admite că, în acest caz, anticorpii reacţionează nu numai cu haptena, ci şi cu micromediul ambiant de pe proteina-purtător.

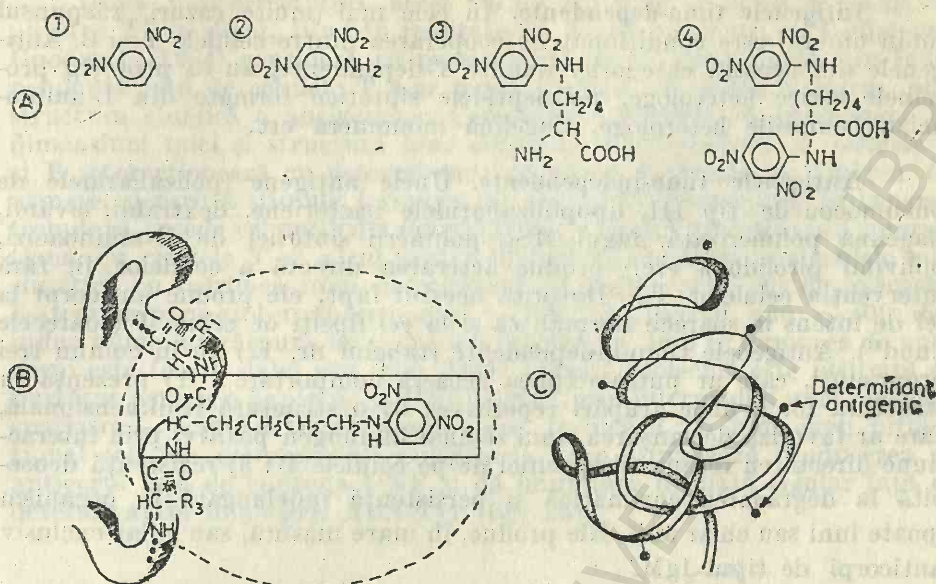


Fig. 15. — Constituenţii antigenelor A. Haptene: 1) m-dinitrobenzen; 2) 2,4-dinitroanilină; 3) ε-DNP-lizină; 4) α, ε-bis-DNP-lizină. B. Gruparea haptenică: o grupare 2,4-dinitrofenil (DNP) substituită grupării ε-NH_2 a unui rest de lizină (încadrată în dreptunghi; determinantul antigenic este încadrat de linia întreruptă). C. Proteină conjugată cu haptene (după Eisen, 1976).

Haptenele autocuplante. În unele cazuri, injectarea la animale a unor substanţe considerate ca haptene, pe baza greutăţii lor moleculare, induce producerea de anticorpi sau determină procese de hipersensibilitate. În această categorie intră o serie de substanţe ca anhidridele acide, sărurile de diazoniu libere, derivaţi ai DNP substituiţi cu fluor sau clor, ca şi unii produşi rezultaţi din degradarea penicilinei (ca, de exemplu, acidul benzilpenicilenic). S-a demonstrat că aceste substanţe denumite haptene autocuplante au proprietatea de a se combina spontan cu proteinele tisulare pentru a forma complexe haptenă — proteină şi că eficienţa lor depinde de capacitatea de a se lega covalent de acestea.

Preantigenele. Sub această denumire au fost descrise o serie de molecule, în general cu greutate mică, neimunogene ca atare, dar capabile să devină antigenice dacă sînt injectate parenteral, prin cuplare cu o proteină din organismul-gazdă. Din această categorie fac parte unele metale ca mercurul, nichelul, precum şi molecule organice ca formaldehida, mercaptanul, clorura de picril, dinitroclorbenzenul etc. În anumite condiţii se pot comporta similar unele răşini şi sterolii. Spre deosebire de haptene, preantigenele produc, în special, reacţii de hipersensibilitate întîrziată. Ele nu se pot lega de receptorii specifici ai celulelor T, decît dacă în prealabil au fost complexate cu o proteină autologă, formînd adevărate antigene „artificiale” *in vivo*, care sînt recunoscute de organism ca nonself.

Antigenele timo-dependente. În cele mai multe cazuri, răspunsul imun umoral este condiţionat de cooperarea dintre celulele T şi B. Antigenele din această categorie, numite T-dependente, au ca prototip proteinele serice heterologe, polipeptidele sintetice formate din L-aminoacizi, hematiile heterologe, flagelina monomeră etc.

Antigenele timo-independente. Unele antigene (polizaharidele de pneumococ de tip III, lipopolizaharidele bacteriene, dextranii, levanii, flagelina polimerizată, fagul MS_2, polimerii sintetici de D-aminoacizi, polivinil pirolidona etc.) produc activarea directă a celulelor B, fără intervenţia celulelor T_H. Datorită acestui fapt, ele produc anticorpi la fel de intens la şoarecii normali ca şi la cei lipsiţi de celule T (şoarecele ,,nud''). Antigenele timo-independente (tabelul nr. 12) au în comun trei proprietăţi, care ar putea explica această comportare: 1) prezenţa în structura lor a unor grupări repetitive; 2) o structură tridimensională, care ar favoriza declanşarea unui semnal imunogen pozitiv, prin interacţiune directă cu receptorii specifici de pe celulele B; 3) rezistenţă deosebită la degradarea enzimatică şi persistenţă îndelungată în organism (poate luni sau chiar ani). Ele produc, în mare măsură, sau chiar exclusiv anticorpi de tipul IgM.

Tabelul nr. 12

Particularităţile antigenelor polimere timo-independente (după Basten şi Howard, 1973)

Antigenul	Compoziţia în monomere	G.m. medic (dal)	Numărul mediu de monomere	Nr. unităţi monomere necesare pentru menţinerea imunogenităţii
Polizaharide de *Streptococcus pneumoniae*	Acid celobiuronic (glucoză + acid glucuronic)	200 000	560	10
Levan	Fructoză	20 000 000	110 000	55
Lipopolizaharide de *E. coli*	Oligozaharide legate de lipopolizaharide	10 000 000	?	?
Polivinil-pirolidona	$-CH_2-CH_2$ (inel: N, H_2C, $C=O$, H_2C—CH_2)	360 000	3 200	90
Flagelină polimerizată	Proteină flagelină	10 000 000	300	<1

După unii cercetători, acest tip de antigene ar necesita totuşi un „ajutor T" moderat, fiind în realitate nu T-independente, ci T-eficiente. Goodman (1984) consideră că particularităţile de dependenţă sau independenţă faţă de celulele T s-ar putea explica, cel puţin în parte, prin structura chimică a antigenelor. Cercetările efectuate cu imunogene cu dimensiuni mici şi structură bine definită au demonstrat că celulele T şi B interacţionează cu determinanţi diferiţi ai moleculei de antigen. Ca urmare, pentru a stimula formarea de anticorpi, imunogenii, în general, trebuie să posede cel puţin doi determinanţi şi anume unul pentru a interacţiona cu celulele T şi altul pentru celulele B. De aceea, moleculele mici sintetice cu mărimea unui determinant antigenic unic, ca, de exemplu, L-tirozina-para-*azob*enzen-*a*rsonatul (ABA-Tyr), avînd g.m. ~409 dal, induc numai un răspuns imun mediat celular, în timp ce formarea de anticorpi este foarte slabă sau nulă. Dacă această moleculă este utilizată de purtător pentru o haptenă ca DNF, legată prin intermediul unei molecule spaţiator — acidul-6-aminocaproic — se formează un imunogen bifuncţional (cu doi determinanţi antigenici), care stimulează producerea de anticorpi faţă de haptena DNF şi dă imunitate mediată celular faţă de determinantul imunogen ABA-Tyr (fig. 16).

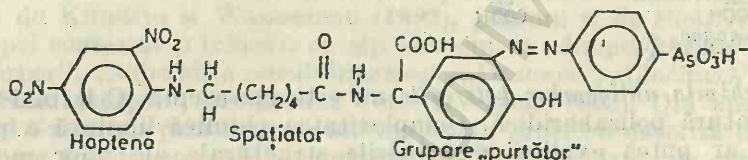


Fig. 16. — Caracterul bifuncţional al antigenului dinitrofenil-6-aminocapril-L-tirozin-p-azobenzenarsonat.

Acest tip de structură e demonstrat ca valabil şi pentru unele molecule de proteine naturale, cum este glucagonul, hormon produs de celulele α din pancreas, care măreşte concentraţia glucozei în sînge. El este alcătuit din 29 de aminoacizi (g.m. ~3 485 daltoni) şi este bogat în serină şi treonină, care favorizează producerea de legături de H între molecule. Considerat iniţial ca haptenă pe baza greutăţii sale moleculare, glucagonul s-a dovedit ulterior ca antigenic, atribuindu-se această proprietate tendinţei sale spre dimerizare spontană. Tratarea glucagonului cu tripsină determină fragmentarea moleculei la un situs fix (Lys-Arg), cu separarea celor două tipuri de determinanţi, care sînt recunoscuţi separat : celulele B recunosc numai determinanţii situaţi în regiunea NH_2 (haptenică), iar celulele T răspund numai la segmentul COOH terminal (regiunea imunogenă) al moleculei (fig. 17).

Antigenele heterofile. Sub denumirea de antigene heterofile sînt reunite o serie de substanţe înrudite chimic, prezente la numeroase specii de animale şi de plante, cu poziţii taxonomice foarte diferite, dar care produc anticorpi ce dau reacţii încrucişate. Prototipul antigenelor heterofile este antigenul Forssman, prezent în ţesuturile de cobai (ficat, rinichi, creier etc.), care, injectat la iepure, produce cantităţi mari de anticorpi

ce aglutinează hematiile de oaie, iar în prezența complementului le lizează. S-a propus ca denumirea de antigen Forssman să fie limitată la acest tip de antigen heterogenetic, descris de Forssman în anul 1911, celelalte antigene urmînd a fi denumite heterofile. Ele au fost evidențiate în hematiile umane, la o serie de animale (cobai, cal, tigru, balenă, cîine, găină, broască etc.) și în celulele de *Streptococcus pneumoniae*. Antigenele heterofile lipsesc la iepure, care poate fi folosit ca animal de laborator pentru producerea de anticorpi.

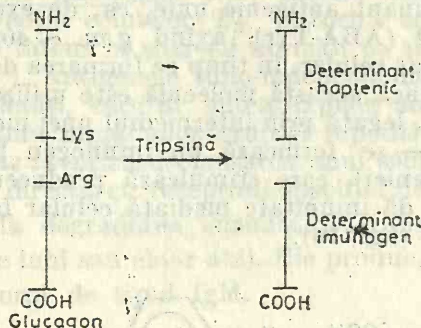


Fig. 17. — Separarea determinanților funcționali imunogeni și haptenici din structura glucagonului.

Biochimia antigenelor heterofile nu este cunoscută. Cele mai multe sînt de natură polizaharidică. Complexitatea chimică limitată a polizaharidelor ar putea explica asemănările structurale ale unor molecule derivate din surse atît de îndepărtate taxonomic. Spre exemplu, polizaharidele capsulare de la *Streptococcus pneumoniae*, tipul III și VIII sînt structural înrudite cu cele din bumbac, datorită conținutului lor în acid celobiuronic (polimer de molecule alternante de D-glucoză și acid-D-glucuronic). Ca urmare, antiserurile respective dau reacții încrucișate. În mod asemănător, antigenele de grup sanguin uman A dau reacții încrucișate cu polizaharidele de pneumococ de tip XIV, iar cele izolate de la grupul sanguin B reacționează cu anticorpii produși de unele tulpini de *E. coli* (Barett, 1976).

Structura și funcțiile imunoglobulinelor

(Pl. 1—3)

„Imunoglobulinele sînt asemănătoare unei garnituri imense de șperacle executate în așa fel, încît cel puțin cîteva să fie capabile să se potrivească în orice tip de lacăt care poate fi imaginat”

D. W. Talmage

Imunoglobulinele (Ig) sînt glicoproteine a căror sinteză este indusă de prezența în organism a unor substanțe antigenice străine. Interesul pentru studiul structurii și funcției lor este legat de calitatea lor de anticorpi, cu rol determinant în reacțiile de imunitate umorală. După Lindemann (1984), termenul de anticorp a fost folosit prima dată de Ehrlich (1891), în lucrarea sa celebră „Studii experimentale asupra imunității”. Preluat de Kitasato și Wasserman (1892), precum și de Pfeiffer (1895), a fost apoi contestat și înlocuit cu alți termeni ca „Immunkörper”, „Zwischenkörper”, „substanță sensibilizatrice”, „Desmon”, „filocitază”, „fixator”, „Schutzkörper”, „imunizină” etc. (London, 1902). Din anul 1905, termenul s-a impus prin consens internațional, probabil datorită ușurinței cu care era folosit colocvial în principalele limbi utilizate de cercetători („antibody”, „anticorps”, „Antikörper”). Anticorpii pot fi definiți ca molecule care posedă situsuri de recunoaștere și de combinare specifică, legate de o structură cu funcții efectoare. Exprimarea lor normală este determinată de necesitatea de a discrimina între substanțele proprii normale („self”) și substanțele nonself, străine, și de a acționa eficient numai față de antigenele nonself. Datorită acestei proprietăți, Ig contribuie eficient la inactivarea și/sau îndepărtarea microorganismelor, toxinelor, paraziților sau diferitelor tipuri de substanțe străine din organism. Ele reprezintă ~ 20% din proteinele plasmatice totale și sînt prezente în serul sanguin, în lichidele extravasculare, secrețiile exocrine și ca receptori pe suprafața unor limfocite.

Studiul structurii imunoglobulinelor a beneficiat larg de progresele din biochimie, biologie, chimia analitică, precum și de dezvoltarea bazei tehnice a acestor domenii. Ele au permis fragmentarea moleculelor de Ig cu ajutorul enzimelor sau/și substanțelor chimice, analiza secvenței aminoacizilor, studierea prin microelectronografie și difracție cu raze X, analiza structurii lor antigenice etc. De o deosebită importanță a fost înțelegerea patogeniei și a bazelor biochimice ale mielomului multiplu, iar mai recent punerea la punct a tehnologiei de producere a anticorpilor monoclonali, care permite obținerea unor cantități mari de imunoglobuline omogene structural. Ansamblul acestor cercetări și în mod particular stabilirea secvenței aminoacizilor în lanțurile polipeptidice au permis stabilirea modelului general de structură a imunoglobulinelor.

Mielomul multiplu (*plasmocitomul*), prezent la om şi la animale (şoarece, şobolan, cîine, cal), este o afecţiune malignă, iniţiată în măduva oaselor, cu tendinţa de diseminare în ţesuturile osoase şi moi. Poate fi indus artificial la două linii de şoarece, în mod deosebit sensibile, BALB/c şi NZB, prin injectarea intraperitoneală de ulei mineral (Pristane) şi transplantat în serie. Plasmocitele animalelor bolnave produc un singur tip de Ig, care formează ~95% din Ig serică şi este uşor de izolat, purificat şi analizat.

Ig de mielom (proteine M, paraproteine, Ig monoclonală) sînt molecule de anticorpi de tip normal, formate de celulele B care au proliferat ca răspuns la antigenele specifice ale unor bacterii intestinale. Ca dovadă, ~5% din proteinele de mielom de la şoarece leagă determinanţi antigenici prezenţi pe suprafaţa unor bacterii intestinale. În unele cazuri, în serul animalelor se acumulează molecule întregi de Ig, iar, alteori, un exces de lanţuri uşoare, care sînt eliminate în urină, fie ca molecule izolate, fie ca dimeri (proteine Bence—Jones). Descrise iniţial de Bence—Jones (1847), proteinele respective, avînd 214 aminoacizi, prezintă o secvenţă diferită de la un bolnav la altul, în special în prima jumătate a lanţului polipeptidic.

Fragmentarea enzimatică a Ig. Porter şi Edelman (1957) au iniţiat studiul Ig prin fragmentare, demonstrînd structura lor multicatenară şi organizarea diferitelor fragmente, ceea ce a permis înţelegerea rolului lor funcţional. Tratarea IgG de iepure cu enzime proteolitice (pepsină, papaină) produce scindarea moleculei în trei fragmente, dintre care două, sînt identice şi poartă, fiecare, cîte un situs de combinare cu antigenul. Ele corespund fragmentelor Fab („*A*ntigen-*b*inding *f*ragment"), deoarece reţin capacitatea de legare a antigenului. Al treilea fragment, mai mare, denumit Fc, corespunde extremităţii COOH-terminale a celor două lanţuri H, unite de una sau mai multe punţi disulfidice S—S. Este denumit fragmentul Fc („*C*rystalizable, cytotropic, complement binding Fragment"), deoarece poate fi obţinut în stare cristalină. Deci, o moleculă de IgG bivalentă este formată din două fragmente Fab univalente, legate prin punţi S—S de un fragment Fc (fig. 18).

Fragmentul Fab conţine regiunile V (variabile, ale catenelor L şi H), regiunea constantă a lanţului L (C_L), precum şi prima regiune constantă (C_H1) a lanţului H. El poate fi scindat pentru a produce fragmentul F_V, care conţine regiunile V_L şi V_H şi separat regiunile C_L şi C_H1. Porţiunea de lanţ greu prezentă în fragmentul Fab este denumită Fd. Tratarea cu pepsină produce un fragment Fc', aproape identic cu Fc, însă mai mic decît acesta.

Fragmentul Fc reţine o porţiune mai mare din lanţul H, corespunzînd regiunii „balama" şi unei părţi din glucid. După îndepărtarea fragmentului Fc' rămîn două segmente Fab, menţinute prin puntea S—S şi peptidul „balama", formînd un fragment mai mare numit F(ab')2, deoarece conţine o porţiune adiţională din lanţul H, care este absentă în fragmentele Fab. El este bivalent. Fragmentarea imunoglobulinelor se poate face şi cu substanţe reducătoare de tipul 2-mercaptoetanol, mercapto-

etilamină sau ditiotreitol, ce au o grupare —SH liberă şi care, cînd sînt prezente în exces, reduc punţile S—S din proteine la —SH. Legăturile mai slabe, necovalente, pot fi rupte la valori extreme de pH (pH 2,0—2,5) sau prin intervenţia unor agenţi disocianţi ca ureea, guadinina sau detergenţii.

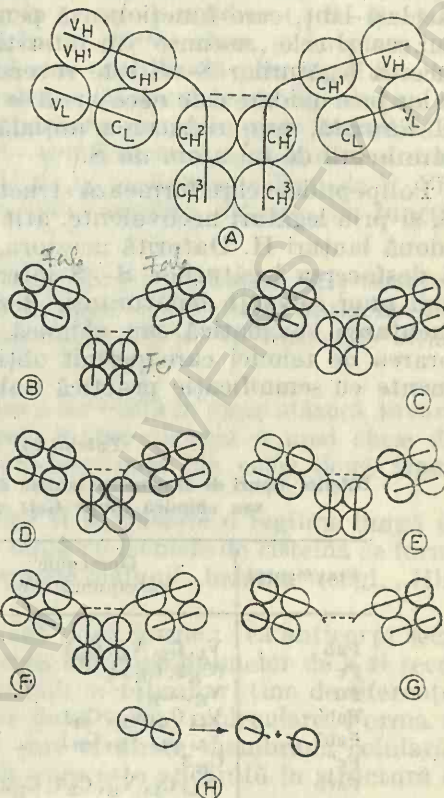


Fig. 18. — Reprezentare schematică a diferitelor fragmente izolate prin clivarea proteolitică a IgG. A. Molecula intactă cu diversele domenii. B. Sus, fragmentele Fab; jos, fragmentul Fc. C. Fab'. D. Fabc. E. Fb(S). F. Fc'. G. Fv. H. V_L şi C_L separate din catenele uşoare. Fragmentele proteolitice izolate sînt indicate printr-un contur îngroşat (după Gall şi d'Eustachio, 1972).

Legăturile disulfidice. Fragmentarea moleculelor de Ig prin reducere şi alchilare a demonstrat că acestea conţin legături S—S, care asigură formarea moleculei tetramere. Prezenţa lor, uneori pînă la 20 — 25 per moleculă, în număr şi cu localizare caracteristică pentru diferitele clase de Ig, le conferă stabilitate, chiar în condiţii anormale (temperaturi foarte scăzute). Diferitele tipuri de legături S—S pot fi grupate în trei categorii:

1) *legături intercatenare* de tipul H—H sau L—H. Legături intercatenare între lanţuri uşoare (L—L) au fost descrise numai la IgA_2 şi la proteina Bence—Jones, care este un dimer de lanţuri L;

2) *legături intercatenare* prezente la moleculele de IgA_2 şi IgM polimere, între lanţurile H ce aparţin diferiţilor monomeri sau unităţi de bază componente;

3) *legături intracatenare* care definesc structura terţiară a lanţurilor.

În ordinea rezistenţei crescînde la disociere prin reducere, legăturile S—S pot fi caracterizate astfel: 1) legăturile intercatenare H—H; 2) legăturile intercatenare H—L; 3) legăturile intracatenare. Datorită structurii tridimensionale a Ig nu toate legăturile S—S sînt accesibile pentru clivare. În condiţii experimentale normale sînt desfăcute numai legăturile intercatenare. Cele intracatenare, localizate între resturi de aminoacizi din acelaşi lanţ, care funcţionează pentru a stabiliza „buclele" polipeptidului, ca şi cele „ascunse" în interstiţiile moleculei scapă de disociere. Reducerea legăturilor S—S este reversibilă. Pentru a preîntîmpina refacerea lor prin oxidare este necesar să se substituie hidrogenul din gruparea —SH formată, prin reducerea iniţială cu iod acetamidă, care leagă o grupare acetil de un atom de S.

Polipeptidele care formează structura Ig sînt legate, pe lîngă punţile S—S, şi prin legături necovalente, atît între lanţurile L şi H, cît şi între cele două lanţuri H. Datorită acestora, moleculele de Ig nu se disociază după desfacerea legăturilor S—S intercatenare, decît dacă sînt expuse acţiunii unor solvenţi denaturanţi. Rezultatele importante obţinute prin fragmentarea enzimatică sau chimică a imunoglobulinelor au stimulat elaborarea de tehnici care permit obţinerea şi caracterizarea a diferite fragmente cu semnificaţie practică (tabelul nr. 13).

Tabelul nr. 13

Diferite tipuri de fragmente izolate din Ig prin clivare enzimatică sau chimică (după Gall şi Eustachio, 1972)

Fragmentul	Domeniile corespunzătoare	Enzimele sau substanţele chimice
Fab	V_L, C_L, V_H, C_H1	Papaină, tripsină
Fc	$(C_H2, C_H3)_2$	Papaină, tripsină
Fd	V_H, C_H1	Papaină
Fab'	V_L, C_L, V_H, C_H1	Pepsină
Fab''	V_L, C_L, V_H, C_H1	BrCN
Fc'	C_H3	Papaină, pepsină
Facb	$(V_L, C_L, V_H, C_H1, C_H2)_2$	Plasmină
Fb(s)	C_H1, C_L	Subtilizină
Fv	V_H, V_L	Pepsină

Clivarea Ig, spre exemplu, la nivelul regiunii „balama" apare şi în condiţii naturale ca o etapă iniţială obligatorie în catabolismul normal al Ig, în procesul endocitozei lor şi, de asemenea, în producerea de fragmente biologic active de peptide imunoreglatoare.

Structura imunoglobulinelor

Cunoaşterea detaliată a structurii imunoglobulinelor este absolut necesară pentru înţelegerea determinismului genetic, a biosintezei, a funcţiilor şi semnificaţiei lor biologice.

Structura de bază a imunoglobulinelor. Unitatea de bază a Ig* este reprezentată de imunoglobulina monomeră, care este o moleculă tetrapeptidică simetrică, formată din asocierea a două lanţuri grele H (engl. *Heavy*= greu), avînd 50 kdal, cu lungime egală (450 aminoacizi), şi două lanţuri uşoare L (engl. *Light*=uşor), de asemenea cu lungime egală (216 aminoacizi, g.m. ~ 25 kdal). Pentru a forma o structură stabilă şi bilateral simetrică, lanţurile L sînt legate de lanţurile H prin punţi disulfidice (—S—S—) intercatenare, al căror număr variază în funcţie de clasa şi subclasa cărora aparţin Ig. Molecula tetrapeptidică este stabilizată prin punţi S—S între lanţurile H, ca şi prin forţe necovalente. Moleculele de Ig conţin, de asemenea, unul sau mai multe componente glucidice, care împiedică o interacţiune prea puternică proteină—proteină la nivelul la care sînt legate domeniile. În ansamblu, moleculele de Ig au forma de T sau de Y. Fiecare lanţ polipeptidic este alcătuit din două regiuni diferite, în funcţie de secvenţa aminoacizilor :

1) *regiunile variabile* (V), situate la extremitatea NH_2 terminală a Ig, răspunzătoare de specificitatea de legare a diferitelor antigene. Pentru a lega antigenele, extremităţile regiunilor V_L şi V_H formează situsurile de combinare ale anticorpilor ;

2) *regiunile constante* (C) conţin o secvenţă în mare măsură invariantă şi asigură uniformitatea structurală şi funcţională a unei clase de Ig. Ele formează extremităţile carboxi-terminale ale celor două tipuri de lanţuri.

Aproape de mijlocul lanţurilor H se găseşte o regiune lungă de 15 resturi de aminoacizi, care include toate moleculele de cisteină ce formează punţi intercatenare S—S. Ea corespunde regiunii „balama" (engl. „Hinge") (fig. 19).

Imunoglobulinele pot exista sub două forme : ca anticorpi secretaţi sau legaţi de membrane. Capacitatea imunoglobulinelor de a fi secretate sau de a funcţiona ca receptori stabili membranari ţine de diferenţele în regiunea carboxi-terminală a celor două forme moleculare. Forma membranară are o regiune hidrofobă care străbate membrana celulară şi o scurtă regiune citoplasmatică, prin care este ancorată în structura membranelor.

Heterogenitatea imunoglobulinelor. Imunoglobulinele formează o familie de proteine, care, deşi au aceeaşi arhitectură moleculară fundamentală, prezintă o gamă enormă de specificităţi de legare a antigenelor şi diferite activităţi biologice. Această heterogenitate este reflectată în primul rînd în comportamentul lor electroforetic (fig. 20), care arată gama largă în care se deplasează în mod normal diferitele tipuri de anticorpi. Banda corespunzătoare Ig se extinde din zona γ-globulinelor, prin cea a β-globulinelor, pînă în zona α-2-globulinelor, demonstrînd existenţa unor variaţii în sarcina lor electrică netă, corelate cu diferenţele în secvenţa aminoacizilor. Spectrul larg de mobilitate electroforetică este dat în mare măsură de prezenţa diferitelor tipuri de anticorpi prezenţi în ser, care aparţin la diferite clase (izotipuri) şi subclase, tipuri şi subtipuri, subgrupe de variabilitate etc.

---

* Modelul general de structură a unităţii de bază se referă la IgG.

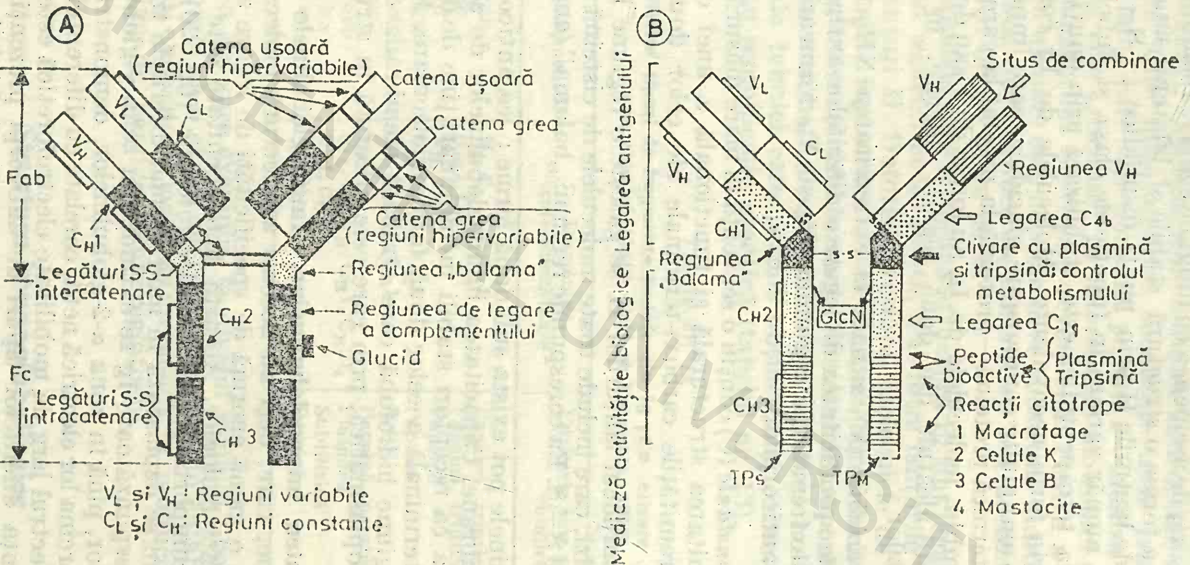


Fig. 19. — Modele generale de structură a imunoglobulinelor bazale pe IgG1 umană, indicînd structura pe domenii a catenelor, poziția regiunilor variabile și hipervariabile ale catenelor L și H, a regiunii „balama" (A), precum și localizarea diferitelor funcții (B) (după Putnam și colab., 1985).

Heterogenitatea moleculară a Ig, care are la bază modificări în secvenţa aminoacizilor, nu este numai rezultatul imensei diversităţi a antigenelor. Ea este reflexul heterogenităţii celulelor producătoare de anticorpi. Datorită acestui fapt, antigenele naturale, care au totdeauna un set de mai mulţi determinanţi antigenici, stimulează mai multe clone celulare, dintre care un anumit număr sintetizează anticorpi faţă de acelaşi determinant antigenic. Ca urmare, serurile normale conţin populaţii de Ig extrem de heterogene.

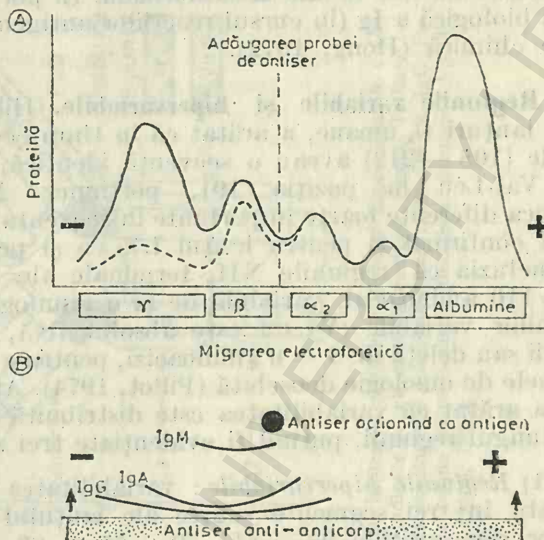


Fig. 20. — Separarea electroforetică a componenţilor unui ser imun. A. Curba continuă prezintă distribuţia proteinelor după electroforeza antiserului specific: linia întreruptă indică distribuţia electroforetică a proteinelor antiserului, după îndepărtarea prealabilă a anticorpilor specifici antigenului cu care au fost produşi (cele două curbe coincid în regiunea din dreapta); literele α, β şi γ se referă la globuline cu caracteristici de mobilitate electroforetică. B. Separarea imunoelectroforetică a anticorpilor din antiser. Liniile indică precipitate antigen — anticorp (după Evans 1976).

Datorită structurii lor de proteine complexe, dacă sînt introduse la alte organisme imunoglobulinele acţionează ca antigene. Astfel au fost obţinute antiseruri care deosebesc diferitele subpopulaţii (engl. „Subsets") ale acestor molecule şi au permis definirea a cel puţin trei tipuri de determinanţi antigenici şi de specificităţi, care sînt folosiţi pentru clasificarea anticorpilor :

1) *Specificitatea izotipică*, întîlnită la toţi indivizii unei specii date, este reprezentată de prezenţa unor determinanţi genetici care diferenţiază regiunile constante ale diferitelor clase şi subclase de catene H, precum şi tipurile de catene L. Este independentă de funcţia de anticorp, dar influenţează funcţiile efectoare ale Ig.

2) *Specificitatea alotipică* este caracteristică pentru Ig unui număr redus de indivizi ai unei specii date. Este reprezentată de determinanţi antigenici ce caracterizează catenele L şi H, reprezentaţi de modificări în secvenţa aminoacizilor din regiunile constante ale lanţurilor polipeptidice. Nu influenţează nici specificitatea şi nici funcţiile efectoare ale Ig.

3) *Specificitatea idiotipică*, reprezentată de determinanţi antigenici cu caracter unic, care deosebesc un anumit domeniu V de alte domenii V.

Ei sînt localizaţi *la* sau *lîngă* situsurile de legare a antigenului, respectiv în segmentele hipervariabile ale lanţurilor L şi H şi condiţionează antigenitatea anticorpilor. Determinanţii antigenici corespunzători celor trei tipuri de specificitate descrise pot fi uneori „ascunşi", adică inaccesibili, cînd molecula este în starea sa normală. Ei pot fi însă revelaţi după activarea biologică a Ig (în cursul reacţiilor antigen-anticorp) sau după modificare chimică (Hong, 1972).

Regiunile variabile şi hipervariabile. Hilschman (1962), analizînd două lanţuri L_k umane, a arătat că în timp ce segmentele COOH—terminale (108 — 212) aveau o secvenţă identică, cu excepţia unei permutări Val-Leu în poziţia 191, porţiunea NH_2-terminală (1 — 107) conţinea diferenţe foarte importante în secvenţa aminoacizilor. Fenomenul a fost confirmat şi pentru lanţul Lλ, ca şi pentru lanţul H. S-a ajuns la concluzia că regiunile NH_2-terminale ale Ig au o secvenţă lungă de ~110 aminoacizi, variabilă de la o imunoglobulină la alta. Mărimea regiunilor variabile (V) nu este absolut fixă, deoarece uneori intervin inserţii sau deleţii de 3 — 6 aminoacizi, pentru a alinia secvenţa „în fază", în zonele de omologie deosebită (Pillot, 1974). Analiza secvenţei aminoacizilor a arătat că variabilitatea este distribuită într-un mod caracteristic de-a lungul regiunii, putînd fi evidenţiate trei zone distincte:

1) *Regiunile hipervariabile*: variabilitatea domeniului V este concentrată în trei segmente scurte ale lanţului L, corespunzînd aminoacizilor din poziţiile 24 — 34; 50 — 55 şi 89 — 97, respectiv în patru segmente ale lanţurilor H, în poziţii aproximativ omoloage: 30 — 36; 50 — 56, 86 — 91 şi 95 — 100 (Wu şi Kabat, 1970; Capra, 1971; 1977). Ele sînt denumite *regiuni hipervariabile* sau *regiuni determinante de complementaritate* (RDC) („Complementary determining regions") şi conţin aminoacizii care mărginesc situsul de combinare al anticorpilor. Poziţia identică a regiunilor hipervariabile în lanţurile L şi H în imunoglobulinele provenite de la toate vertebratele studiate sugerează că ea ar oferi un avantaj selectiv şi ar fi corelată cu mecanismul particular de producere a diversităţii anticorpilor.

2) *Regiunile relativ invariante.* Cele trei regiuni hipervariabile sînt dispuse printre patru regiuni cu variabilitate redusă, denumite *regiuni cadru* („Framework regions"). Ele formează ~80 — 85% din lungimea domeniilor V. Variaţia la nivelul lor este foarte redusă (~5%). Regiunile-cadru corespund în special principalelor curburi ale lanţului polipeptidic pliat în spaţiu, ceea ce sugerează un anumit rol structural, probabil corelat cu organizarea pe domenii a Ig (fig. 21). De asemenea, ele sînt răspunzătoare de structura în general similară a situsului de combinare la toţi anticorpii. Ele ar avea în special rolul de a forma o suprastructură necesară pentru dispunerea aminoacizilor din segmentele determinante de complementaritate într-o poziţie potrivită pentru a veni în contact cu antigenul (Jeske şi Capra, 1984). Regiunile au, de asemenea, aceleaşi dimensiuni şi aceeaşi poziţie în Ig de la toate animalele superioare studiate, fapt care reflectă, şi în acest component important al răspunsului imun humoral, unitatea biologică generală.

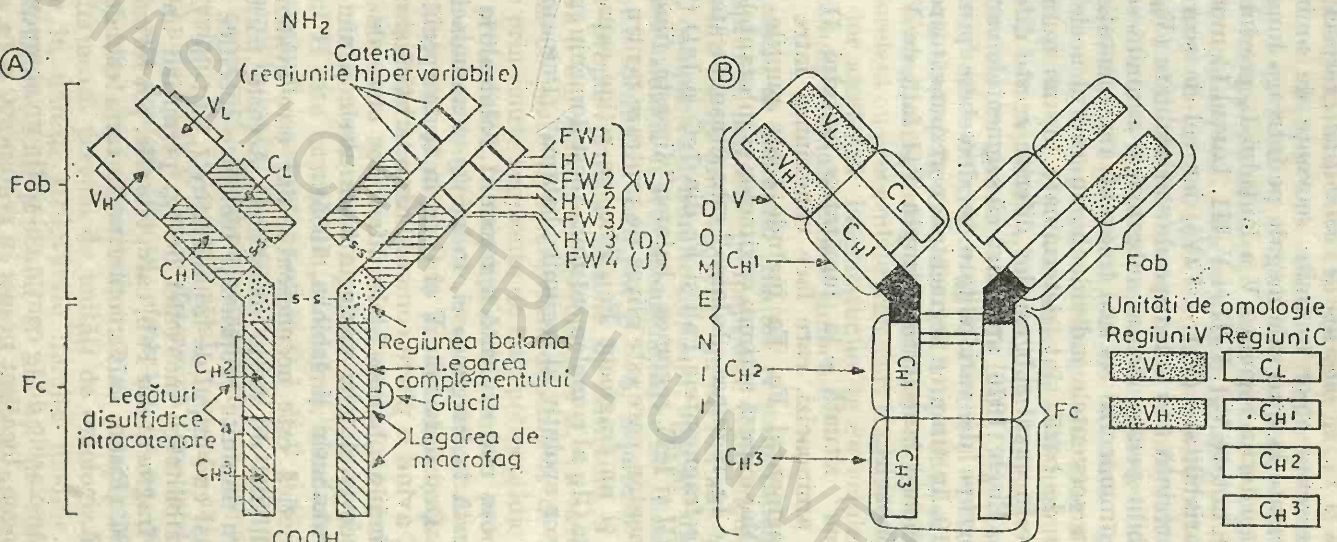


Fig. 21. — A. Structura unei molecule de anticorp, cu indicarea poziției regiunilor hipervariabile (HV) și cadru (FW) în catenele H. În paranteze (V, D, J) sînt indicate genele care le codifică (după Teilland și colab., 1983). B. Reprezentare schematică a unităților de omologie și domeniilor unei molecule de IgG. Perechile de unități de omologie se pliază împreună pentru a forma patru domenii globulare, denumite V, CH^1, CH^2 și CH^3 (după Hood, 1984).

3) A treia categorie de zone particulare permite clasificarea regiunilor variabile (V_K, $V\lambda$ şi V_H) în *subgrupe de variabilitate*, respectiv în seturi caracterizate prin prezenţa unor anumite secvenţe de aminoacizi, în anumite poziţii, dispersate la intervale inegale pe întreaga lungime a segmentului V. Pe acest criteriu, regiunea V a lanţului L_K prezintă trei subgrupe de variabilitate, notate V_KI, V_KII şi V_KIII. Lanţul Lλ uman prezintă cinci subgrupe de variabilitate (VλI — VλV), iar cel de şoarece 12. În sfîrşit, regiunea V_H prezintă trei subgrupe de variabilitate (V_HI—V_HIII). Milstein (1967) a stabilit pentru fiecare subgrupă o anumită secvenţă de bază, constituită din aminoacizii cel mai frecvent reprezentaţi în fiecare poziţie. Diferenţele în secvenţele individuale, în cadrul aceleiaşi grupe, raportate la secvenţa de bază, sînt determinate de un număr mic de permutări, în timp ce în cazul subgrupelor diferite aceste diferenţe sînt mult mai mari. Astfel, Eisen (1976) apreciază că segmentele variabile care aparţin aceleiaşi subgrupe de variabilitate se deosebesc prin 10 — 15 aminoacizi, din cei 110, în timp ce segmentele corespunzătoare din subgrupe diferite ale aceluiaşi lanţ (spre exemplu V_KI faţă de V_KII) diferă prin 25 — 35 de aminoacizi.

Regiunea „balama" situată ~ la jumătatea lanţului H este un segment lung de 15 aminoacizi, care face conexiunea între cele două fragmente Fab şi fragmentul Fc. Ea include toate punţile disulfidice intercatenare H—H. Mai expusă acţiunii enzimelor şi substanţelor chimice decît alte segmente ale Ig, regiunea „balama" este situsul de atac al papainei, pentru a produce fragmentele Fab şi Fc din IgG şi IgD (Takahashi şi colab., 1982). La IgM şi IgE, regiunea „balama" lipseşte, fiind înlocuită de un domeniu suplimentar, care este clivat de proteaze pentru a produce două fragmente Fab şi un fragment Fc ciclic, ce reţine capacitatea de legare a componentului C1q al complementului. Acest domeniu suplimentar pare să fie un precursor evolutiv al regiunii „balama" (Putnam şi colab., 1985).

Particularitatea cea mai evidentă a regiunii „balama" la IgG, IgA şi IgD este variaţia netă în lungimea ei, în secvenţa aminoacizilor şi în conţinutul în glucide. Deşi domeniile V şi C de la toate speciile studiate sînt înrudite evolutiv, avînd o pliere comună, caracteristică şi o omologie de ~ 20 — 35%, regiunile „balama" ale diferitelor clase de lanţuri H nu sînt omologe ca secvenţă, nici unele faţă de altele şi nici cu restul moleculei (Putnam, Takahashi şi Ishioka, 1985).

Originea lor genetică este necunoscută, dar este evident că este codificată de exoni diferiţi de restul moleculei. Această particularitate pare să fie corelată cu anumite proprietăţi biologice specifice diferitelor clase de Ig şi în special cu timpul de înjumătăţire („half-life"). Regiunea „balama" asigură flexibilitatea moleculei de Ig, permiţînd un grad important de mobilitate fragmentelor Fab, care, teoretic, pot forma un unghi ce variază între 0 şi 180° (Eisen, 1976), conferind Ig caracterul de molecule cu geometrie variabilă.

Glucidele Ig. Toate clasele de Ig conţin cel puţin un component oligozaharidic foarte heterogen, localizat numai în regiunea C a Ig, sub forma unor catene laterale simple sau complexe, al căror număr, tip şi situs de

legare diferă și este caracteristic pentru fiecare clasă. Glucidele Ig conțin glucoză, galactozamină (GalN), manoză, fucoză și acid sialic.

Tipul cel mai comun constă din glucide care conțin glucozamină (GlcN) cu g.m. ~ 2 500 — 3 000 dal, în care un rest de N-acetilglucozamină al lanțului lateral glucidic este legat printr-o legătură N-glicozidică de un rest de asparagină, din structura polipeptidului. Oligoglucidele cu GlcN pot avea fie o structură simplă, cu conținut ridicat în manoză, fie o structură dublu sau triplu ramificată și obișnuit heterogenă. Al doilea tip comun constă din glucide cu resturi de galactozamină cu g.m. ~ 750 dal, legate O-glicozidic, fie de serină, fie de treonină. IgG, indiferent de subclasă sau specie, are aparent totdeauna un singur oligoglucid, GlcN în poziția 297 pe lanțul Hγ. Lanțurile α_1 și δ umane au 4 — 5 resturi de galactozamină în regiunea „balama", iar lanțurile μ și ε, cîte cinci.

Conținutul în glucide variază între 3% (IgG) și 13% (IgE) din masa moleculară a diferitelor Ig (Putnam și colab., 1985). Fixarea glucidului are loc cînd Ig trec din RER în complexul Golgi, probabil sub acțiunea transglicozidazelor membranare nespecifice. Adiția glucidelor pare a fi corelată cu procesul de transport transmembranar și cu secreția Ig. Prezența lor afectează interacțiunile Ig cu celulele, ca și interacțiunile laterale și longitudinale dintre domenii.

Conceptul de domeniu. Analiza cristalografică în raze X a Ig a evidențiat faptul că lanțurile polipeptidice componente ale acestora nu sînt localizate sub forma unor secvențe lineare, ci sînt pliate, formînd regiuni globulare, compacte, denumite domenii, spațial distincte, avînd o structură tridimensională foarte asemănătoare. Pe baza cunoașterii structurii primare și a localizării punților S — S, Edelman (1970) și Cunningham (1971) au propus primele modele de structură a domeniilor. Diferitele domenii au o autonomie termodinamică și, ca urmare, o structură tridimensională ce poate fi dobîndită independent de alte domenii. Ele sînt conectate prin scurte segmente de lanț polipeptidic ca mărgelele pe o ață. Digestia proteolitică în condiții suboptimale produce clivarea limitată a Ig între domeniile globulare, ceea ce demonstrează că regiunile pliate compact sînt mai protejate de proteoliză, comparativ cu cele extinse, care sînt mai ușor accesibile.

În structura IgG au fost descrise două domenii pentru lanțul L și anume unul corespunzător regiunii variabile V_L și altul regiunii constante C_L. Lanțul H este format din 4 domenii, unul variabil (V_H) și trei corespunzînd regiunii constante, notate C_H1, C_H2 și C_H3 (fig. 21). IgM și IgE au 5 domenii în lanțul H, respectiv unul în regiunea variabilă și patru în regiunea constantă. Studiul comparativ al secvenței aminoacizilor în diferite regiuni ale Ig a evidențiat existența unei omologii structurale între domeniile V_H și V_L (care determină funcția de anticorp), ca și între domeniile care conferă funcții efectoare, ca de exemplu C_H2 —C_H2.

Domeniile din fiecare lanț nu sînt independente de cele din lanțul opus, ci formează perechi de unități de omologie strîns asociate, care se constituie în unități structurale numite module. Unitățile structurale astfel constituite sînt probabil și unități de funcție biologică. Astfel, domeniile V_L sau V_H izolate au numai o slabă capacitate de a lega antigenul comparativ cu forma lor asociată, care constituie situsul de combinare al Ig.

Au fost descrise două tipuri de interacţiuni între domeniile adiacente: 1) *interacţiuni de tip cis*, pe verticală, între două domenii învecinate; 2) *interacţiuni de tip trans*, pe orizontală, între domeniile situate pe lanţuri diferite, cu excepţia cuplului C_H2-C_H2. Interacţiunile necovalente de tip trans definesc modulii. Ele sînt mai puternice între domeniile constante, (ca de exemplu C_H1-C_H1 şi C_H3-C_H3), deoarece domeniile au suprafeţe mari de contact, iar legăturile de contact sînt în special de natură hidrofobă. De altfel, în general, domeniile cu poziţii omologe pe catene diferite, ca de exemplu V_L şi V_H sau C_L şi C_{H1}, interacţionează mai puternic decît două domenii adiacente pe aceeaşi catenă. Folosind o terminologie diferită, Hood şi colab. (1984) folosesc termenul de domeniu pentru a caracteriza modulii, adică perechile de omologie strîns asociate (fig. 21). După nomenclatura lor, unităţile de omologie V_L şi V_H formează domeniul V, C_L şi C_H1, domeniul C_H1, cele două unităţi C_H2, domeniul C_H2, iar cuplul C_H3-C_H3, domeniul C_H3.

Structura internă a domeniilor. Domeniile Ig au o formă globulară compactă, care se înscrie într-un cilindru, cu un Ø de ~3,5 nm şi sînt formate din ~60 de aminoacizi (fig.22). Fiecare domeniu este stabilizat

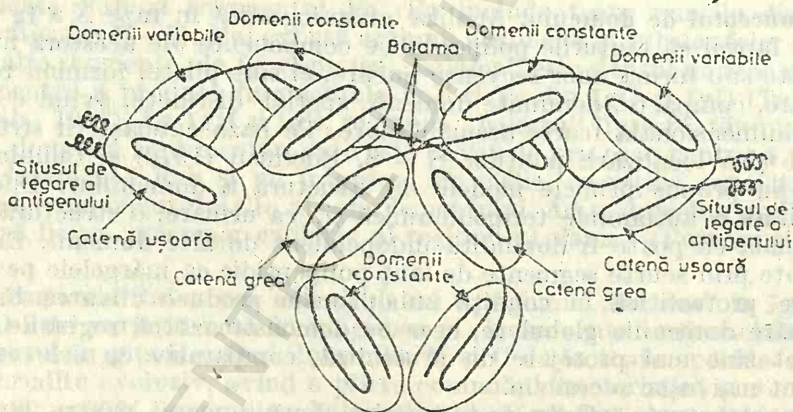


Fig. 22. — Reprezentare schematică a domeniilor din structura unei molecule de anticorp (după Tonegawa, 1985).

printr-o punte S—S, situată în regiunea centrală a unei unităţi de omologie formată din 110 aminoacizi (~12 000 dal). Toate domeniile analizate prezintă un model unic, caracteristic, de pliere antiparalelă a lanţului polipeptidic, descris sub denumirea de „plierea Ig" sau „β-pliere" („Immunoglobulin folding"). El constă din „împachetarea" lanţului polipeptidic sub forma unor segmente drepte, paralele cu axul lung al domeniului, grupate în două straturi: primul strat este format din trei segmente de lanţ, iar al doilea, din patru segmente. În toate cazurile, segmentele adiacente din fiecare lanţ sînt orientate în direcţii opuse (fig. 23) şi sînt stabilizate prin legături de H intercatenare, în aşa fel încît iau o formă

tridimensională numită „structură β". Cele două straturi amplasate în planuri diferite sînt legate printr-o punte S—S. Deşi domeniile V_L şi V_H au o buclă adiţională, modul lor de pliere este foarte asemănător cu cel al regiunilor constante, fapt neaşteptat, ţinînd seama de diferenţele mari dintre ele în secvenţa aminoacizilor.

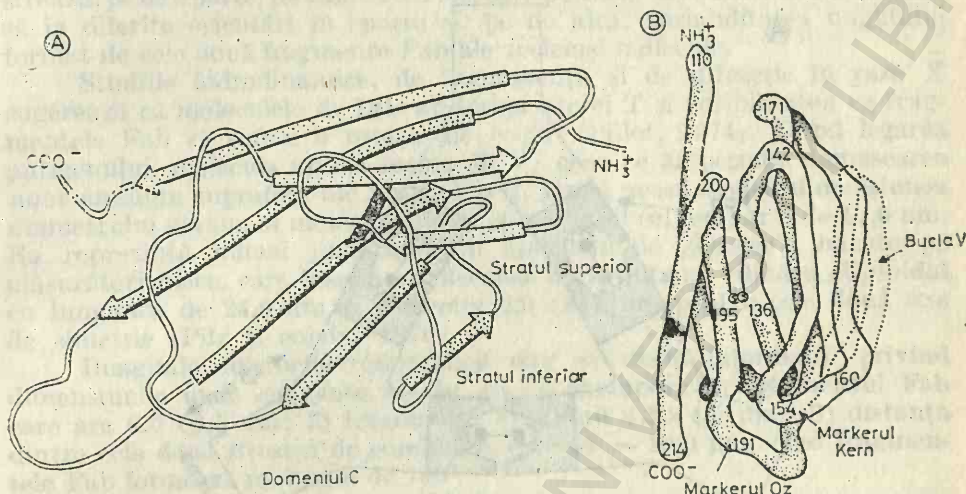


Fig. 23. — Plierea catenelor polipeptidice din structura imunoglobulinelor. A. Tipul fundamental de pliere a catenei polipeptidice în domeniul constant al moleculei de anticorp îi conferă o formă cilindrică şi o structură în „sandwich". Stratul superior este format din trei catene adiacente, iar cel inferior, din patru. Cele două straturi sînt menţinute împreună de o punte disulfidică (după Capra şi Edmundson, 1979). B. Reprezentare schematică a aranjamentului catenei polipeptidice corespunzător domeniului C_L (linia continuă). Aminoacizii adiţionali corespunzînd segmentului V_L sînt prezentaţi în bucla conturată lateral (linia punctată) (după Poljak, 1973).

După Capra şi Edmundson (1977), această structură comună a domeniilor, care a persistat, deşi domeniile variabile au avut o evoluţie divergentă şi o specializare funcţională diferită, s-ar datora prezenţei în ambele tipuri de domenii a unor aminoacizi hidrofobi în regiunea „internă" a domeniului, care determină un tip de pliere similar. Relaţiile de omologie dintre domenii sugerează că genele V şi H actuale au evoluat prin duplicare şi divergenţă de la o singură genă primordială, care codifică un polipeptid de 110 aminoacizi. Modelul structural al domeniilor Ig reprezintă în acelaşi timp şi un model funcţional, deoarece diferitele domenii realizează suportul molecular al diferitelor funcţii de recunoaştere şi specificitate ca şi a celor efectoare.

Forma şi dimensiunile imunoglobulinelor

Valentine şi Green (1967), utilizînd o haptenă riguros bivalentă, bis-N-DNP-octometilendiamina, care se poate lega specific de două molecule de Ig anti-DNP, au evidenţiat prin microscopie electronică forma moleculelor de Ig, localizarea situsului de combinare, morfologia complexe-

lor antigenanticorp şi au făcut unele aprecieri asupra dimensiunilor unor segmente.

Ig combinate cu haptenele prezintă imagini geometrice, cele mai frecvente fiind cele de triunghi sau de pătrat. Ele rezultă din legarea a trei sau respectiv a patru molecule de Ig (fig. 24) cu formă de y, reunite

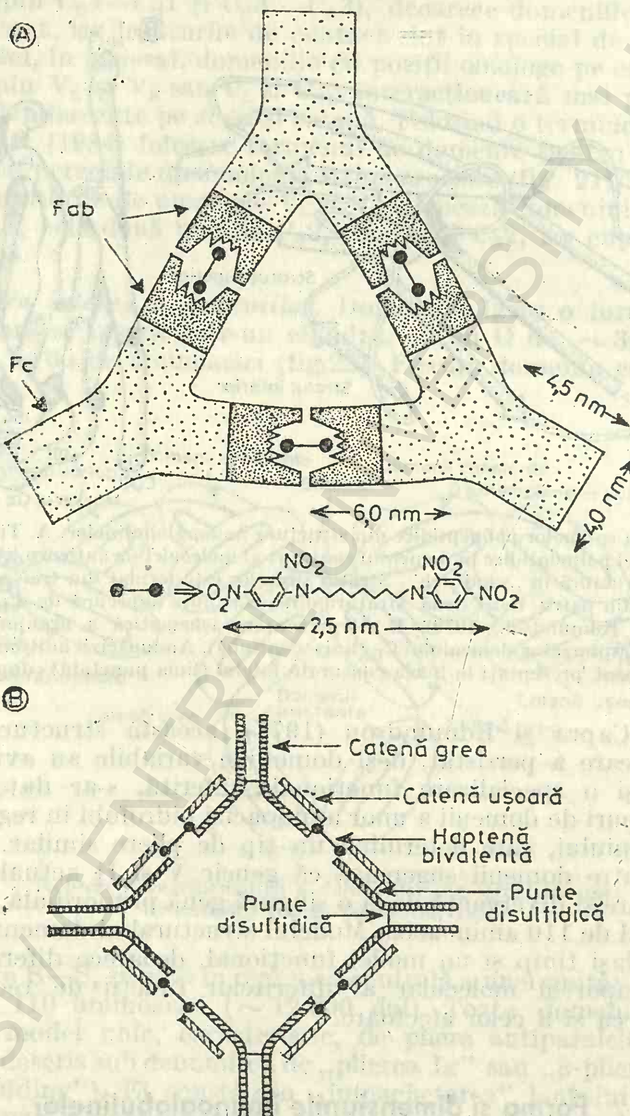


Fig. 24. — Microelectronografia complexelor haptenă — anticorpi (reprezentare schematică). A. Structuri triunghiulare formate din complexe de trei molecule de anticorp legate de trei haptene bivalente de dinitrofenil (după Jerne, 1973). B. Imagine în pătrat, rezultată din combinarea a patru haptene bivalente cu patru molecule de Ig (după Pillot, 1984). Dimensiunile sint calculate de Green şi Valentine pe baza microelectronografiilor.

prin cele două brațe care, corespunzînd fragmentelor Fab, poartă situsurile de legare și reacționează cu haptena. Fiecare unghi al structurilor geometrice poartă o prelungire, ce poate fi îndepărtată prin tratare cu papaină și care corespunde fragmentului Fc. Imaginile demonstrează bivalența anticorpilor. Prezența unor configurații diferite ale Ig demonstrează, pe de o parte, flexibilitatea lor, care permite situsurilor de combinare să ia diferite orientări în spațiu și, pe de alta, variabilitatea unghiului format de cele două fragmente Fab ale aceleiași molecule.

Studiile hidrodinamice, de fluorescență și de difracție în raze X sugerează că moleculele de IgG au forma literei T și posibilitatea ca fragmentele Fab să sufere o rotație de $\sim 30°$ (Pillot, 1974). După legarea antigenului, molecula ar lua forma de Y, ceea ce ar permite demascarea unor anumite suprafețe ale lanțurilor H. După acest model, dimensiunea diametrului maxim al moleculei de Ig (și probabil cel real) ar fi de 12,0 nm. Ea reprezintă numai jumătate din dimensiunile „clasice", bazate pe măsurători fizice, care înscriau moleculele de Ig într-un cilindru elipsoidal cu lungimea de 24,0 nm și respectiv $2{,}0 \times 6{,}0$ nm pentru cele două axe de simetrie (Pilz și colab., 1970).

Imaginile microelectronografice dau și unele informații privind dimensiunile unor segmente ale Ig, ca de exemplu: 1) fragmentul Fab care are $6{,}0 \times 3{,}5$ nm; 2) fragmentul Fc avînd $4{,}5 \times 4{,}0$ nm; 3) distanța dintre cele două situsuri de combinare este de $\sim 10{,}0$ nm, cînd fragmentele Fab formează un unghi de 180°.

Variantele izotipice ale imunoglobulinelor. Lanțurile grele și ușoare

Oudin (1974) a denumit specificități izotipice particularitățile de specificitate antigenică comune imunoglobulinelor aparținînd indivizilor normali dintr-o specie dată. Ansamblul lor definește izotipul unei Ig, care este reprezentat la nivel molecular de prezența unor grupări chimice caracteristice, localizate mai ales în regiunile constante ale acestora.

Izotipurile (gr. *iso* = același) marchează diferențele antigenice ce caracterizează clasele și subclasele de lanțuri H și tipurile și subtipurile de lanțuri L. Fiecare individ normal exprimă toate izotipurile caracteristice speciei, deoarece fiecărui izotip îi corespunde un locus genetic distinct în genom. Izotipurile pot fi recunoscute cu ajutorul anticorpilor produși de o specie față de Ig produse de altă specie (antiser specific heterolog).

Izotipurile lanțurilor L. La om există două tipuri de lanțuri ușoare (L) prezente în toate clasele de Ig: *lanțurile kapa* (*k*) și *lambda* (λ), care pot fi deosebite pe baza diferențelor lor structurale în regiunea constantă, ce se reflectă în diferențe antigenice. Imunoglobulinele conțin fie două lanțuri k, fie două lanțuri λ identice, niciodată ambele. De aceea, formula IgG, spre exemplu, este fie $k2\gamma2$, fie $\lambda2\gamma2$ (niciodată $\lambda k\gamma2$). Lanțurile L au ~ 214 aminoacizi (g.m. $\sim 23\,000$ dal) și pot fi divizate în două regiuni, în funcție de natura secvenței aminoacizilor: 1) *regiunea variabilă V* corespunde pozițiilor 1—108 și 2) *regiunea constantă C* care include pozițiile 109—214. Regiunea V poate varia cu o lungime de 1—16 aminoacizi.

Raportul dintre lanţurile k şi λ, diferit după specie, este de 70/30 la om, 95/5 la şoarece şi 80/20 la iepure. Este probabil că el ar reflecta raportul dintre numărul genelor pentru regiunea V, care ar fi la om aproximativ egal, în timp ce la şoarece numărul genelor pentru regiunea Vk ar fi mult mai mare decît pentru regiunea Vλ. Structura primară a izotipurilor K şi λ este diferită şi, ca urmare, cele două tipuri de lanţuri nu au determinanţi antigenici comuni. Omologiile dintre regiunile C ale lanţurilor k umane şi de şoarece sînt mult mai mari (~62%) decît cele dintre lanţurile k şi lanţurile λ la aceleaşi specii. Aceasta sugerează că cele două tipuri de lanţ L s-au separat în cursul evoluţiei, înainte de divergenţa speciilor de mamifere.

Markerii izotipici. Analiza secvenţei aminoacizilor a evidenţiat existenţa pe lanţul λ a doi markeri antigenici diferiţi, provenind din permutări punctiforme de aminoacizi : 1) *factorul Kern*$^+$ corespunde Gly în poziţia 154 şi *factorul Kern*$^-$ corespunde Ser în aceeaşi poziţie ; 2) *factorul Oz*$^+$ corespunzînd Lys în poziţia 190 şi factorul *Oz*$^-$ cu Arg în aceeaşi poziţie. Se obţin astfel următoarele izotipuri L :

Izotipul	C1		C2		C3	
Markerul izotipic	Kern$^-$	Oz$^-$	Kern$^-$	Oz$^+$	Kern$^+$	Oz$^-$
Poziţia	154	190	154	190	154	190
Aminoacidul	Ser	Arg	Ser	Lys	Gly	Arg

Regiunile Cλ aparţinînd lanţurilor λ din Ig umane sînt caracterizate prin prezenţa a trei variante izotipice, codificate de gene distincte şi anume : Cλ1 (Kern$^-$ Oz$^-$), Cλ2 (Kern$^-$ Oz$^+$) şi Cλ3 (Kern$^+$ Oz$^-$). Lanţurile k au două subtipuri diferite kA şi kB, corespunzînd produşilor a două gene diferite. Lanţul kB este predominant cantitativ şi este caracterizat de prezenţa unei punţi S—S suplimentare, intracatenară, între domeniile V_L şi C_L.

Izotipurile lanţurilor H corespund la cinci tipuri diferite, denumite λ, α, μ, δ şi ε, care se deosebesc prin structura regiunilor constante (C). Ele determină clasele imunoglobulinelor denumite IgG, IgA, IgM, IgD şi respectiv IgE şi pot fi decelate prin metode chimice, serologice, ca şi prin activitatea lor biologică. Lanţul H al IgG are 446 aminoacizi, dintre care 108—125 corespund regiunii V şi 321—325 regiunii C. Deci, regiunea V_H are ~aceeaşi lungime ca şi V_L, în timp ce regiunea C_H este de ~ trei ori mai lungă. Diferitele izotipuri sau clase de catene H sînt asociate cu funcţii efectoare diferite, deoarece acestea depind de structura regiunilor constante ale polipeptidelor.

Numeroase fapte de observaţie au demonstrat existenţa următoarelor funcţii biologice dominante ale claselor de Ig :

1) IgG prezintă cele mai multe particularităţi funcţionale caracteristice anticorpilor şi determină imunitatea pasivă la făt ;

2) IgA asigură rezistenţa imunitară în secreţii, la nivelul mucoaselor şi manifestă o activitate netă antivirală ;

3) IgM reprezintă anticorpul caracteristic primei faze a rezistenţei imunitare (răspunsul primar) şi este important pentru liza bacteriilor;

4) IgD are rol de receptor pe limfocitele B, în fazele timpurii ale diferenţierii lor;

5) IgE are rol de reagină, mediator principal în reacţiile alergice.

Izotipurile nu au nici o legătură cu funcţia de legare a antigenelor. Ca urmare, acelaşi antigen poate fi legat specific de anticorpi care aparţin oricăreia din cele cinci clase de Ig.

Subclasele Ig. Studiul IgG de la om şi diferite specii animale (şoarece, cobai, oaie, capră, bovine etc.) a demonstrat existenţa unor diferenţe în proprietăţile lor fizice, chimice şi biologice care permit divizarea în subclase. Ig din diferite subclase au în comun o serie de determinanţi specifici clasei lor, cărora li se adaugă o serie de determinanţi proprii, ce definesc fiecare subclasă, marcînd un nivel de heterogenitate suplimentar, legat de structura catenelor grele (H). Organizaţia mondială a sănătăţii (1966) a propus denumirea celor patru subclase descrise pentru IgG, pe baza concentraţiei lor relative în serul normal sau în proteinele de mielom. Subclaselor IgG1>IgG2>IgG3>IgG4 le corespund, cu variaţiile individuale inerente, următoarele valori, după Shakib şi Stanworth (1980): 70—80%, 13—18%, 6—8% şi 3%; după Goodman (1984): 60—70%, 14—20%, 4—8% şi 2—6%. Aceste diferenţe sînt explicabile prin tehnicile diferite folosite, prin vîrsta persoanelor studiate, ca şi prin existenţa unor variaţii fiziologice sau patologice nedetectate.

Chimia subclaselor de Ig. Ig din diferite subclase se deosebesc în funcţie de mai multe particularităţi (tabelul nr. 14). Caracterul cel mai important care diferenţiază diferitele subclase constă în numărul şi poziţia punţilor disulfidice intercatenare (fig. 25).

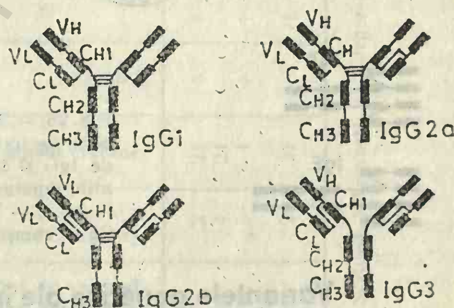


Fig. 25. — Modele de structură ale subclaselor de IgG de la şoarece (după Seiler, 1985).

La IgG1, lanţurile L sînt legate aproape de mijlocul lanţurilor H, în timp ce la celelalte subclase sînt legate la ~3/4 din lungimea catenei faţă de capătul NH_3. IgG1 are două punţi disulfidice între lanţurile grele, IgG2 are 4, IgG4 are 2, iar IgG3, considerat iniţial ca avînd 5 legături intercatenare S—S, ar avea, în realitate, 13 (Stanworth şi Shakib,

1980). Diferenţele în secvenţa aminoacizilor la diferite subclase sînt relativ mici (24 de resturi de aminoacizi între IgG1 şi IgG4), spre deosebire de domeniile echivalente ale Ig din clase diferite, care prezintă o omologie de numai ~ 40%. Cu toate acestea, ele generează diferenţe în activităţile mediate de Fc sau de sensibilitate la catabolism, care sugerează existenţa unor deosebiri de configuraţie terţiară în regiunile respective.

Shakib şi Stanworth (1980) au arătat că în cursul vaccinării, Ig din diferitele subclase sînt produse de plasmocite independent unele de altele. Unele persoane vaccinate antitetanic produc IgG3 sau IgG4, altele şi IgG3 şi IgG4. Această comportare poate reflecta diferenţe genetice între indivizi, condiţii în care unele clone de plasmocite sînt stimulate şi altele represate sau ar depinde de calea de imunizare şi de modul de prezentare a antigenelor.

Kunkel şi Pendergast (1966) au descris două subclase de IgA, notate IgA1 şi IgA2 (fig. 26).

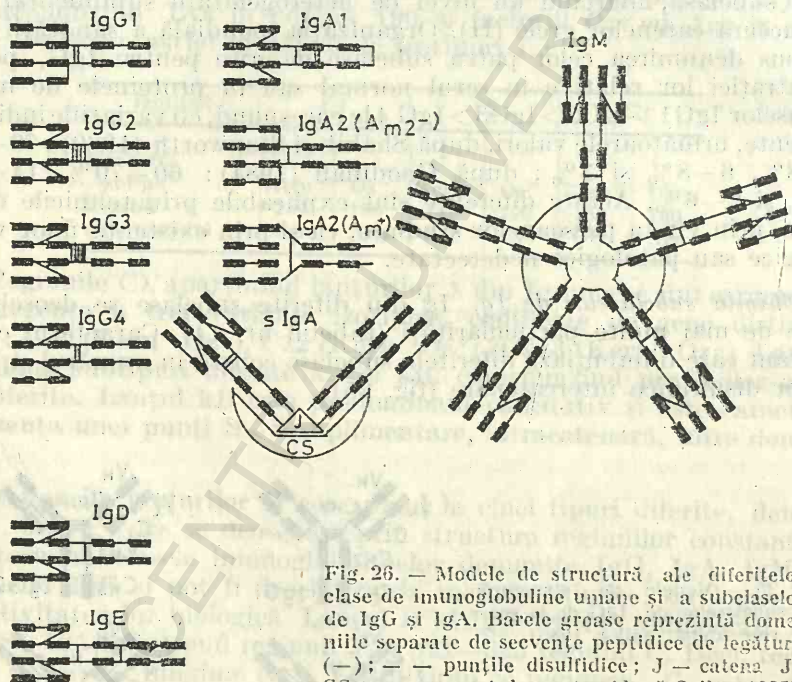


Fig. 26. — Modele de structură ale diferitelor clase de imunoglobuline umane şi a subclaselor de IgG şi IgA. Barele groase reprezintă domeniile separate de secvenţe peptidice de legătură (—); — — punţile disulfidice; J — catena J; CS — componentul secretor (după Seiler, 1985).

Variantele genetice ale imunoglobulinelor. Alotipurile

Grubb (1956, 1970) şi Oudin (1960) au descris polimorfismul genelor care codifică Ig la iepure şi respectiv la om. Ei au demonstrat că imunizarea unui individ cu imunoglobuline provenite de la alt individ din aceeaşi specie determină apariţia de anticorpi faţă de specificităţile antigenice ce caracterizează Ig donatorului. Fenomenul este general în sensul că

Tabelul nr. 14

Unele proprietăţi fizico-chimice şi biologice ale subclaselor de IgG.

Subclasa	Lanţul greu	Localizarea determinanţilor specifici de subclasă	Numărul punţilor S—S intercatenare	Durata medie de viaţă/zile	Sensibilitatea la digestie cu: Papaină	Tripsină	Plasmină	Pepsină	Transfer placentar	Activarea complementului (calea clasică)	Activităţi citofile: Legarea de receptorii limfocitelor omologe	Legarea de receptorii monocitelor omologe	Legarea de receptorii Fc ai polimorfonuclearelor neutrofile	Anafilaxie pasivă la cobai	Mobilitate electroforetică
IgG1	1	Fc	2	21	+	+++	+++	+	+	++	+	+	+	+	lentă
IgG2	2	Fc	4	21	—	+	+	+	+	+	+	—	+	—	rapidă
IgG3	3	Fd	5*	7,1	+	+++	+++	+++	+	+++	+	+	+	+	medie
IgG4	4	Fc şi Fab	2	21	—	+++	+	+++	+	—	—	—	+	+	ra pidă

* 13 punţi S—S după Stanworth şi Turner (1978).

mai multe substanţe provenite de la un organism pot fi în mod natural imunogene cînd sînt introduse la alte organisme din aceeaşi specie, la care se comportă ca *aloantigene* (gr. *allos* = altul).

Oudin (1960) a introdus termenul de *alotip* pentru a desemna diferitele variante genetice ale Ig, condiţionate de prezenţa unor determinanţi antigenici specifici. Aloantigenele sînt deci substanţe provenite de la un anumit organism, care sînt imunogene pentru alte organisme din aceeaşi specie. În cazul Ig, aceşti determinanţi antigenici, numiţi *markeri genetici ai Ig* sau *markeri alotipici*, sînt reprezentaţi de mici diferenţe regulate în secvenţa aminoacizilor din anumite regiuni ale moleculelor de Ig, în rest similare (Spiegelberg, 1973). Spre deosebire de markerii izotipici, care sînt comuni tuturor indivizilor din aceeaşi specie, markerii alotipici sînt prezenţi numai la un număr redus de membri ai unei specii. Aceasta face ca un anumit izotip să poată avea mai multe structuri alternative. Prezenţa lor explică existenţa unui polimorfism al lanţurilor L şi H, care se transmite mendelian, deoarece este specificat de alele codominante la un locus complex autosomal. De aceea, un determinant alotipic dat poate fi prezent pe toate sau doar pe jumătate din imunoglobulinele subclasei sale, după cum individul este homozigot sau heterozigot (Eisen, 1976).

Alotipurile pot fi detectate cu ajutorul aloantiserurilor, adică cu antiseruri omologe, formate de un organism după ce i s-au injectat imunoglobuline provenite de la alt organism din aceeaşi specie, dar care are un alotip diferit. Determinanţii antigenici alotipici sînt localizaţi în regiunea constantă a lanţurilor L şi H şi numai rar în regiunea variabilă. Au fost evidenţiaţi pe lanţurile L_K la om şi la iepure, pe lanţurile H la om, şoarece şi iepure şi pe lanţurile L la iepure. Imunoglobulinele umane pot prezenta trei categorii de markeri alotipici : 1) *factorii Gm* pe lanţurile H ale subclaselor de IgG; 2) *factorii A2m (1)* şi *A2m (2)* pe lanţurile $H\alpha 2$ ale subclasei IgA2; 3) *factorii Km(Inv)* pe lanţurile L de tip k.

Heterogenitatea antigenică a lanţului H al IgG umane. Factorii Gm. Grey şi Kunkel (1964) au arătat că toate lanţurile H ale IgG poartă determinanţi antigenici majori, localizaţi în regiunea Fc, caracteristici pentru fiecare din subclasele acesteia (IgG1 — IgG4). În plus faţă de aceştia, lanţurile γ ale fiecărei subclase pot purta determinanţi antigenici care permit crearea unor subdiviziuni numite *alotipuri*, ca, de exemplu, *markerul Gm* (*G*ama *m*arker). Au fost descrise 25 de antigene diferite cu alotipul Gm (Gm1 — Gm25), care pot fi detectate cu antiserurile numerotate în acelaşi mod şi notate în plus cu semnul + sau —, după cum Ig reacţionează sau nu cu un anumit ser aglutinant. Spre exemplu, Ig cu alotipul Gm (3, — 1) reacţionează cu antiserul Gm (3), dar nu şi cu anti Gm (1). Alotipurile Gm sînt inegal răspîndite la cele patru subclase de IgG*. Spre exemplu, lanţul $\gamma 2$ poartă markerii Gm 8,9 şi 23, în timp ce $\gamma 1$ are markerii Gm 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 17, 18 şi 20. De menţionat însă că nu toţi markerii caracteristici pentru o subclasă de Ig sînt prezenţi pe toate moleculele care aparţin subclasei respective. Există posibilitatea ca unii să se găsească

* Nomenclatura actuală a alotipurilor menţionează şi subclasa Ig de la care provin, spre exemplu : Gm3(24) înseamnă marker gama subclasa 3, cu determinantul antigenic 24.

pe unele molecule, iar alţii pe altele. Bazele chimice ale diferenţelor antigenice dintre alotipurile Gm nu sînt bine cunoscute. Este demonstrat însă că prezenţa sau absenţa unui anumit marker este determinată de secvenţa aminoacizilor şi că substituirea unuia sau a doi aminoacizi duce la absenţa unui marker sau la înlocuirea lui cu altul. Spre exemplu, markerul Gm(5) are fenilalanină în poziţiile 296 şi 436. Înlocuirea cu tirozină în ambele poziţii duce la specificitatea alotipică Gm(21). Glm (17) are lizina în poziţia 214, iar Glm(3) are arginina în aceeaşi poziţie.

Heterogenitatea lanţurilor L. Dintre lanţurile L, numai lanţul K prezintă markeri alotipici, la toate clasele de Ig care au în structura lor lanţuri de acest tip. Ei au fost descrişi sub denumirea de *markeri Inv* (*In*hibitor al reacţiei cu serul bolnavului *V*ictor). Parish (1973) a propus denumirea mai corectă de *factor Km* (*K*apa *m*arker). Au fost descrise trei variante alotipice: Km(Inv), în funcţie de natura aminoacidului din poziţiile 153 şi 191 şi anume Km(1) Ala, Leu; Km(2) Val, Leu; Km(3) Ala, Val.

Aplicaţii practice ale alotipiei. Detectarea particularităţilor alotipice ale Ig are aplicaţii importante în studiul sintezei *in vivo* şi al evoluţiei Ig, în datarea aproximativă a unor mutaţii care au generat motive antigenice noi, în aprecierea reuşitei grefelor de ţesuturi hematopoetice, în stabilirea sau excluderea paternităţii, în antropologie, precum şi în genetica populaţiilor, pentru aprecierea rolului metisajului în patrimoniul genetic actual al unor populaţii.

Idiotipurile

Pe lîngă determinanţii antigenici izotipici şi alotipici, imunoglobulinele prezintă încă un tip de specificitate determinat de *idiotipie*. Termenul de *idiotip* se referă la o categorie de determinanţi antigenici, prezentă pe moleculele individuale, produsă de o anumită clonă de celule formatoare de anticorpi (gr. *idios* — individual). Idiotipurile au fost descoperite de Oudin (1974), care a demonstrat că anticorpii anti-*Salmonella typhi* produşi pe iepure, injectaţi unui alt iepure avînd acelaşi alotip ca şi donatorul induc formarea de anticorpi care reacţionează specific cu anticorpii produşi de primul animal. Aceasta demonstrează că datorită unicităţii lor structurale, anticorpii se pot comporta ei înşişi ca antigene. Ulterior s-a demonstrat că specificitatea idiotipică este legată exclusiv de regiunile hipervariabile ale lanţurilor L şi H, datorită existenţei la nivelul acestora a unor determinanţi individuali numiţi *idiotopi*. Colecţia de idiotopi din structura unei molecule de Ig formează idiotipul ei.

În ansamblu, după comparaţia lui Hood şi colab. (1984), idiotopii prezenţi pe fiecare anticorp pot fi asemănaţi unor litere, cu ajutorul cărora este realizat idiotipul, corespunzînd semnăturii proprii a unui anumit individ. Utilizînd terminologia generală din imunologie se poate spune că un idiotip este determinat de un set de epitopi (determinanţi genetici) numiţi idiotopi şi că fiecare fragment Fab al unei molecule de Ig prezintă un situs de combinare cu antigenul (paratop) şi un mic set de

epitopi sau idiotopi, care formează idiotipul acesteia. Unii idiotopi sînt localizaţi foarte aproape de situsul de combinare cu antigenul („site-related"). Existenţa lor poate fi demonstrată prin ocuparea situsului de combinare al Ig de către antigenul sau haptena respectivă, care împiedică legarea anticorpilor antiidiotipici. Alţi idiotopi sînt mai îndepărtaţi de situsul de legare („non-site related") (fig. 300). Suportul molecular al idiotipiei este reprezentat de o conformaţie unică, specială, situată în regiunea hipervariabilă a lanţului H sau L. În majoritatea cazurilor însă este evidentă participarea ambelor lanţuri. Dovada o constituie faptul că după reasocierea lanţurilor inactive separat, anti-idiotipul reacţionează numai cu moleculele reconstruite corect, care redobîndesc, în acelaşi timp, activitatea originară a antigenului. Fiecare moleculă de Ig are un idiotip unic sau particular („private idiotype"), amplasat în aceeaşi zonă a regiunii variabile şi produs de celulele B aparţinînd aceleiaşi clone. Au fost descrise şi idiotipuri „comune", care reacţionează încrucişat („public idiotype"), prezente pe imunoglobuline diferite, faţă de un antigen dat, produse de indivizi diferiţi, dar identici din punct de vedere genetic (ca, de exemplu, şoarecii „inbred").

După Jerne (1974), repertoriul idiotipurilor ar fi de acelaşi ordin de mărime cu cel al paratopilor, respectiv al Ig. Detectarea specificităţii idiotipice se face cu ajutorul antiserurilor produse de un organism imunizat faţă de anticorpii produşi de alt organism, aparţinînd aceleiaşi specii şi cu acelaşi alotip. Bazele genetice ale idiotipiei nu sînt cunoscute. Exprimarea unui idiotip ar fi legată de locusuri situate pe genele care codifică lanţurile H şi L sau pe cele ale CMH. Anticorpii specifici pentru idiotopi ar juca un rol important în organism, acţionînd ca elemente reglatoare critice în activitatea sistemului imunitar şi în evoluţia răspunsului imun (Jerne, 1974, 1985) (vezi capitolul *„Teoria reţelei idiotipice a sistemului imunitar")*. Tabelul nr. 15 prezintă sintetic principalele caracteristici fizico-chimice, imunochimice şi biologice ale imunoglobulinelor umane.

Tabelul nr. 15

Proprietăţile fizico-chimice, imunochimice şi biologice ale imunoglobulinelor umane

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Clasa de lanţ H	γ	α	μ	δ	ϵ
Tipul de lanţ L	k sau λ	k sau λ	k sau λ	k sau λ	k sau λ
Formula moleculară	$L_2\gamma_2$	$L_2\alpha_2$ sau $(L_2\alpha_2)_2$ ● J ●CS	$(L_2\mu_2)_5$ ●J	$L_2\delta_2$	$L_2\epsilon_2$
Greutatea moleculară/dal	150 000	160 000*	900 000	180 000	200 000
Constanta de sedimentare (S)	7	7, 10, 13—15, 17	18—20	7	8
Mobilitatea electroforetică	γ_1 lentă γ_2, γ_4 rapidă γ_3 medie				

* Unitatea de bază tetrapeptidică

Tabelul nr. 15 (continuare)

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Glucide %	2–6	5–15	5–15	18	18
Numărul oligoglucidelor/lanţ H	1	2 sau 3	5	?	5
Alţi componenţi	—	J~ 15 000 dal CS~ 70 000 dal	J~ 15 000 dal	—	—
Concentraţia medie în ser (mg/100 ml)	1 000	200	120	3	0,05
Variante izotipice şi subclase de lanţ H	IgG1–IgG4	IgA1–IgA2	IgM1–IgM2	—	—
Subtipuri de lanţ L	kA ; kB ; Cλ1(Kern⁻Oz⁻) ; Cλ2(Kern⁻Oz⁺) ; Cλ3(Kern⁺Oz⁻)				
Subgrupe de variabilitate	VkI, VkII, VkIII, VλI, VλII, VλIII, VλIV, VλV, VHI, VHII				
Variante alotipice (lanţ H)	Gm1–Gm5	A2m(1) A2m(2)	—	—	—
Viteza de sinteză/mg/zi	30	30	4	0,4	?
Viteza de catabolism/%/zi	4–7	14–34	4	0,4	?
Timpul de înjumătăţire/zile	21	6	5	3	2
Apariţia sintezei la nou-născut	Ultima	Intermediară	Prima	?	?
Apariţia în cursul răspunsului imun	Ultima	Intermediară	Prima	?	?
Activarea complementului	+	—	++++	—	—
Liza bacteriilor	+	+	+++	—	—
Inhibarea replicării virale	+	+++	+	?	?
Activitatea reaginică	—	—	—	—	+++
Transferul placentar	+++	—	—	—	—
Principalele funcţii de anticorpi	Opsonine, lizine, aglutinine, precipitine	Ig secretoare pe mucoase, coproanticorpi, colostru	Opsonine, lizine, aglutinine, precipitine	?	Reagine

Relaţiile dintre structura şi funcţiile imunoglobulinelor

Imunoglobulinele au două categorii de funcţii majore în ansamblul sistemului umoral de apărare:

1) specificitatea faţă de antigen, exteriorizată prin capacitatea de recunoaştere fină şi de combinare cu determinanţii antigenici complementari, în general cu origine străină;

2) funcţiile biologice efectoare, amorsate de reacţiile antigen — anticorp, care declanşează o serie de evenimente ce duc la eliminarea antigenului străin.

Modul în care se exprimă această dualitate funcţională reflectă particularităţile de dualitate structurală: numărul situsurilor de recunoaştere şi de combinare specifică este extrem de mare ($> 10^8$), în timp ce numărul funcţiilor efectoare este comparativ foarte mic, datorită numărului limitat de situsuri efectoare (Leder, 1982; Putnam, Takahashi şi Ishioka, 1985). Prezenţa variaţiei şi a constanţei într-o singură moleculă de proteină are o mare importanţă funcţională. Regiunea variabilă, pliată în spaţiu, determină, în funcţie de natura modificărilor în secvenţa aminoacizilor, structura chimică şi spaţială a situsului de combinare cu antigenul şi odată cu acesta capacitatea de legare a unor antigene diferite. Ea poate fi asemănată cu modificările zimţilor unei chei, care modifică posibilitatea ei de a se potrivi într-un anumit lăcaş. Funcţiile efectoare ale Ig sînt dependente exclusiv de regiunile constante ale moleculelor de modul în care acestea îşi îndeplinesc „obligaţiile imunologice" în organism (Leder, 1982). Regiunea constantă, analogă funcţional mînerului unei chei, poate fi identică de la o cheie la alta, indiferent de tipul ei, deoarece serveşte aceleiaşi funcţii, comună pentru toate cheile. Ea are la fiecare clasă de Ig aceleaşi funcţii, indiferent de „profilul" molecular al situsului de combinare. Diferenţele funcţionale dintre Ig reflectă diferenţe structurale între diferitele domenii efectoare din structura regiunii constante a lanţurilor H.

Specificitatea anticorpilor. Situsul de combinare cu antigenul

În mod normal, răspunsul global al organismului chiar faţă de un antigen simplu este foarte heterogen sub raportul anticorpilor produşi. Cele mai multe antigene au determinanţi multipli şi fiecare dintre ei activează altă clonă de celule B, cu specificitate similară, dar nu identică. De aceea, serul oricărui individ conţine o colecţie extrem de heterogenă de anticorpi, a căror specificitate reflectă experienţa sa, mai mult sau mai puţin complicată, de expunere la diferite antigene (fig. 27). Cu toate acestea, deşi spectrul de specificităţi este enorm, una din particularităţile cele mai remarcabile ale unui ser imun este capacitatea de a reacţiona specific cu antigenul corespunzător, putînd discerne diferenţe minore în structura unui antigen, ca, de exemplu, schimbarea unui singur aminoacid (leucină în loc de valină pe un lanţ lateral) sau înlocuirea unui aminoacid aparţinînd seriei D cu acelaşi aminoacid din seria L (Reichlin, 1974).

Un exemplu concret este cel furnizat de Moloney (1960), care a arătat că insulina are o compoziţie foarte asemănătoare la diferitele organisme. Singurele diferenţe se înregistrează în natura aminoacizilor din poziţiile

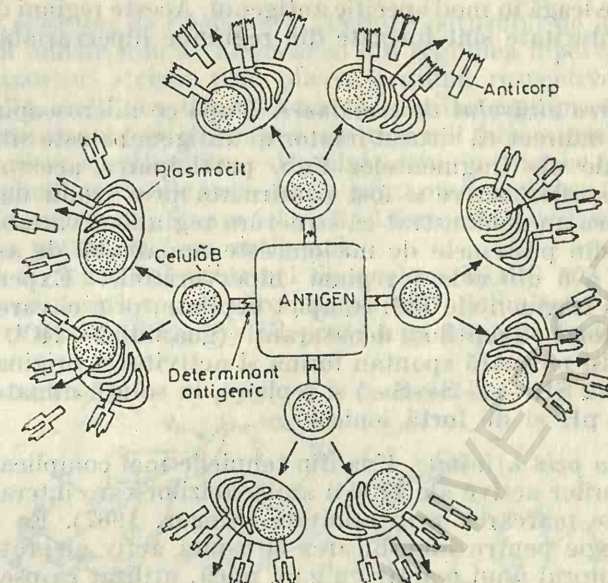


Fig. 27. — Heterogenitatea răspunsului în anticorpi. Schema simplificată reprezintă o moleculă de antigen ce poartă patru determinanţi antigenici (epitopi). În cursul răspunsului imun sînt selecţionate patru subpopulaţii de celule B, care se diferenţiază la plasmocite, ce produc patru tipuri de Ig-anticorp, fiecare specific pentru un anumit epitop (după Kennedy, Melnick şi Dreesmann, 1985).

8, 9 şi 10, care pot diferi în 1—2 cazuri. Cu toate acestea, insulina cu diferite provenienţe dă reacţii serologice încrucişate cu antiserul produs cu insulina bovină (tabelul nr. 16).

Tabelul nr. 16

Relaţiile dintre structura chimică a insulinei şi reacţiile serologice (după Moloney, 1960)

Speciile	Aminoacizii prezenţi în lanţul A în poziţiile			Reacţia cu serul antiinsulină bovină
	8	9	10	
Vacă	Alanină	Serină	Valină	Pozitivă
Oaie	Alanină	Glicocol	Valină	Pozitivă
Porc	Treonină	Serină	Izoleucină	Pozitivă
Balenă	Treonină	Serină	Izoleucină	Pozitivă
Cal	Treonină	Glicocol	Izoleucină	Pozitivă
Iepure	Treonină	Serină	Izoleucină	Pozitivă

Situsul de combinare cu antigenul. Jerne (1974) a propus denumirea de *paratop* pentru situsul de combinare al Ig, în acord cu cea de epitop decomandată pentru a înlocui pe cea de determinant antigenic. Ambele renumiri, relativ ignorate de specialişti aproape un deceniu, revin în

actualitate sub impulsul progreselor din imunologia modernă (vezi cap. „Teoria reţelei idiotipice a sistemului imunitar"). Fiecare Ig monomeră are două situsuri active, situate la extremităţile N-terminale ale fragmentelor Fab, care leagă în mod specific antigenul. Aceste regiuni determinante de complementaritate sînt formate din regiunile hipervariabile ale lanţurilor L şi H.

Localizarea situsului de combinare. După ce microscopia electronică a demonstrat indirect că situsul fixator al antigenelor este situat la extremităţile distale ale fragmentelor Fab, participarea acestor regiuni în formarea situsurilor active a fost confirmată prin studii de difracţie în raze X. Acestea au demonstrat că structura regiunilor variabile ale lanţurilor L şi H din proteinele de mielom este remarcabil de asemănătoare, cu excepţia a 5 din cele 7 regiuni hipervariabile. Experimental s-a demonstrat că fragmentele Fab complet depliate, prin clivarea legăturilor S—S cu ajutorul agenţilor denaturanţi (guanidină—HCl, 7 M) devin inactive. Ele îşi recapătă spontan forma şi activitatea originară de legare după oxidare (2 SH → —S—S—) şi repliere, în soluţii diluate, în condiţii fiziologice de pH şi de forţă ionică.

Marcarea prin afinitate. Una din tehnicile mai complicate de identificare a situsurilor active ale Ig şi a aminoacizilor care interacţionează cu antigenele este marcarea prin afinitate (Singer, 1967). Ea este folosită şi în enzimologie pentru identificarea situsului activ al proteinelor enzimatice, cu ajutorul unui reactiv cu g.m. mică, utilizat ca pseudosubstrat. Întrucît legarea haptenelor cu Ig este reversibilă, tehnica foloseşte haptene care conţin o grupare chimică specială ce le permite legarea ireversibilă prin formarea de legături covalente, cu catenele laterale ale anumitor aminoacizi din structura situsului sau din apropierea lui.

Ulterior, anticorpii sînt degradaţi pentru a permite analiza peptidului care conţine aminoacizii legaţi prin intermediul lui de haptenă. Marcarea haptenelor cu ^{3}H sau ^{14}C permite identificarea aminoacidului legat. În general s-au folosit haptene cu grupări care reacţionează cu tirozina, lizina, cisteina, histidina etc. Se poate deduce poziţia anticorpului marcat şi faptul că legarea s-a făcut în situsul activ, urmărind cinetica de fixare a haptenei modificate pe anticorp. Cele mai multe cercetări s-au făcut cu săruri de diazoniu, care marchează selectiv tirozina. Au fost, de asemenea, utilizaţi o serie de reactivi fotosensibili (azoturi aromatice, diazocetone etc., care expuse la radiaţiile U.V. în complexul Ig — haptenă sînt activaţi şi produc grupări nitren sau carben, capabile să reacţioneze ireversibil cu legăturile C—H, N—H sau S—H, marcînd selectiv anumiţi aminoacizi.

Experienţele de marcare prin afinitate au arătat că toţi aminoacizii legaţi de haptenele modificate sînt localizaţi în regiunile hipervariabile. Legarea este mai frecventă în lanţul H decît în L. De asemenea, sînt legaţi unii aminoacizi din regiunile relativ invariante. Se demonstrează astfel că : 1) specificitatea situsului de combinare cu antigenul este determinată de resturile de aminoacizi situate în regiunea hipervariabilă a lanţurilor V_L şi V_H ; 2) toate situsurile de combinare au o infrastructură comună, răspunzătoare de stabilitatea conformaţională a fragmentului F_V,

care asigură, pe de o parte, marea diversitate a aminoacizilor, răspunzătoare de specificitatea anticorpilor, și, pe de altă parte, o poziție fixă a situsului.

Natura situsului de combinare. „Pereții" situsului de legare sînt formați dintr-un număr mic de aminoacizi din regiunea hipervariabilă, care, dispuși în raporturi strînse prin plierea regiunii respective, delimitează o „scobitură" („cleft") ce diferă ca formă, mărime și proprietăți de legare. Diferitele proeminențe și adîncituri ale regiunii hipervariabile formează suprafața cu mare specificitate a situsului activ, în timp ce funcția majoră a restului regiunii variabile este de „a prezenta" regiunea hipervariabilă în spațiul tridimensional, în așa fel încît să formeze o cavitate sau o scobitură care „se potrivește" cu antigenul.

Situsul de legare al proteinei de mielom MOPC 603 de la șoarece are forma unor maxilare, ai căror pereți sînt delimitați de aminoacizii regiunii hipervariabile (fig. 28). El poate lega haptena fosforilcolina care

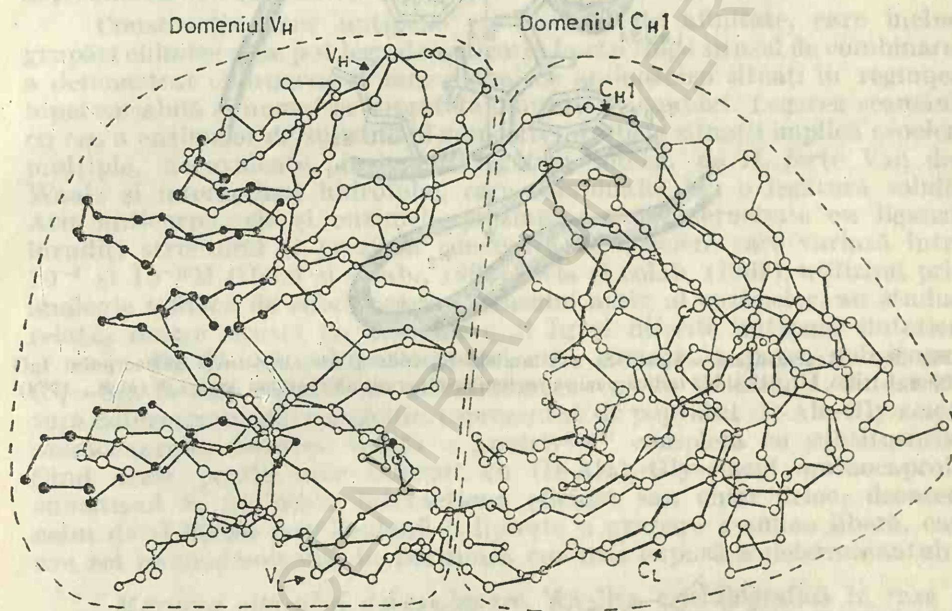


Fig. 28. — Reprezentare schematică a scheletului (α-carbon) fragmentului Fab al proteinei de mielom MOPC 603 de la șoarece. Regiunile hipervariabile asociate cu situsul de legare sînt indicate prin cercuri negre (după Davies, 1976).

ocupă numai o parte din cavitate, fiind legată asimetric, mai aproape de regiunea H decît de L (Capra și Edmundson, 1977). Situsul New al Ig de mielom uman, care leagă o moleculă de vitamina K_1 hidroxilată, are forma unei scobituri superficiale (fig. 29), în timp ce dimerul Bence-Jones prezintă o cavitate conică mai profundă și mai largă, conectată cu o „pungă" derivată din cavitatea principală. Ea pare să aibă trei situsuri distincte de legare și anume două în cavitatea principală și al treilea în „pungă" (fig. 30). După Capra și Edmundson (1977), toate

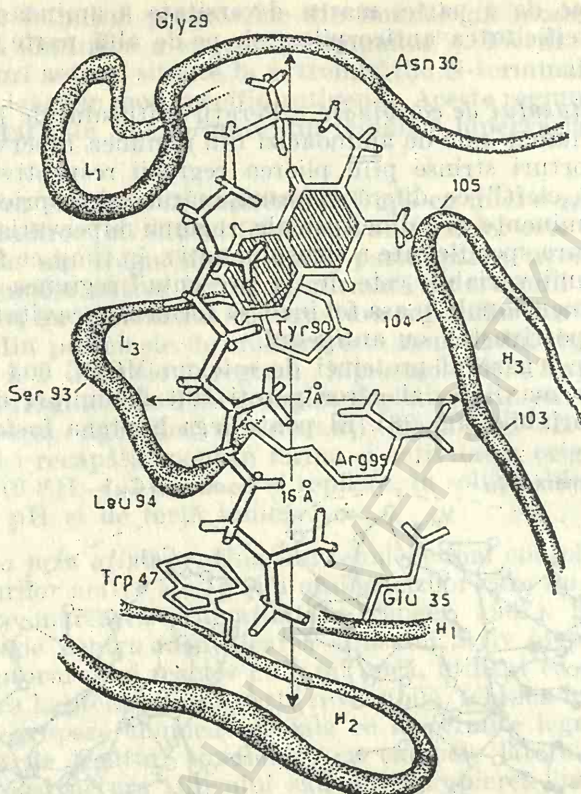


Fig. 29. — Reprezentare schematică a vitaminei K_1 hidroxilate, în situsul anticorpului IgG New. L1, L3, H1, H2 și H3 indică poziția regiunilor hipervariabile (după Amzel și colab., 1974).

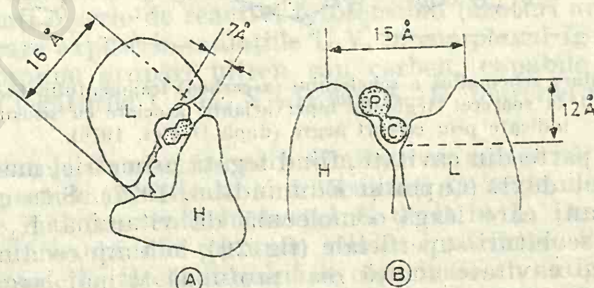


Fig. 30. — A. Reprezentare schematică a vitaminei K_1OH (punctat), în situsul de legare a Ig New de mielom uman (vedere de sus) (după Richards și colab, 1976). B. Vedere laterală a interacțiunii dintre IgMOPC 603 și haptena fosforilcholina (PC) (după Padlan, 1975).

situsurile au o infrastructură comună, răspunzătoare de poziţia fixă şi de stabilitatea conformaţională a situsului de combinare, în timp ce diversitatea în secvenţa aminoacizilor determină specificitatea acestuia. Antigenul „umple" întreaga cavitate a situsului activ, iar buclele regiunii hipervariabile, în special cele proeminente par să fie flexibile, în aşa fel încît situsul de legare se poate extinde pentru a acoperi o suprafaţă cît mai mare a antigenului.

Factorii care determină specificitatea pentru un antigen sau haptenă. Specificitatea de legare a unui antigen depinde de forma „scobiturii" situsului de legare, respectiv de secvenţa aminoacizilor şi de proprietăţile grupărilor chimice care îi delimitează pereţii. Specificitatea este deci bazată pe complementaritatea moleculară dintre determinanţii antigenici şi resturile de aminoacizi din situsul activ. Forma concavă a situsului asigură o mare suprafaţă de contact, iar aşezarea grupărilor laterale ale aminoacizilor în localizări precise conferă avantaje maxime pentru interacţiunile dintre antigen şi anticorp.

Construcţia unor antigene cu markeri de afinitate, care includ grupări chimice ce se pot lega de anticorpi *la* sau *lîngă* situsul de combinare, a demonstrat că legarea se face numai de aminoacizii situaţi în regiunea hipervariabilă şi numai la suprafeţe limitate de contact. Legarea seamănă cu cea a enzimelor de substratul respectiv. Ambele situaţii implică asocieri multiple, necovalente, incluzînd legături ionice, de H, forţe Van der Waals şi interacţiuni hidrofobe, care combinate dau o legătură solidă. Atît anticorpii, cît şi enzimele prezintă reacţii încrucişate cu liganzii înrudiţi structural şi prezintă constante de asociere care variază între 10^{-4} şi 10^{-10}M (Hood şi colab., 1984). Sela şi colab. (1969), utilizînd prin analogie tehnica de subdivizare a situsului activ al enzimelor, au studiat relaţia dintre situsul de combinare al Ig şi diferite antigene sintetice.

În fig. 31, situsul anticorpului este divizat în patru subsitusuri (S_1-S_4), fiecare capabil să interacţioneze cu un aminoacid din structura determinantului antigenic, reprezentat de peptidul D-Ala-Gly-ε-acid aminocaproic, deoarece există o „potrivire" completă cu subsitusurile. Cînd acest peptid este înlocuit cu $(D\text{-}Ala)_2$-Gly-ε-acid aminocaproic, subsitusul S_1 nu poate interacţiona eficient sau chiar deloc, deoarece celui de-al doilea rest D-alanil îi lipseşte o grupare α-amino liberă, care are rol imunodominant, în porţiunea cea mai expusă a determinantului.

Mărimea situsului de combinare. Analiza cristalografică în raze X a arătat că nu numai forma, dar şi dimensiunile situsului activ pot varia semnificativ. Ele pot fi apreciate indirect, prin capacitatea unor haptene cu mărime cunoscută crescîndă, de a împiedica fixarea unor antigene macromoleculare. Kabat (1968) apreciază că un pentazaharid ocupă complet situsul, în timp ce un trizaharid produce doar o inhibare semnificativă. Schechter şi colab. (1970) consideră că un tetrapeptid ar realiza acelaşi lucru, în cazul anticorpilor antiproteine. Dimensiunile maxime ale situsului de combinare în extensie totală, calculate pe baza dimensiunii hexozelor, folosite de Kabat pentru a „umple" complet situsurile antidextran, ar fi de $34 \times 12 \times 6$ Å. În măsura în care situsul activ formează o invaginare, care poate înconjura un oligomer format din 4—6 aminoacizi, se consideră că numai ~ 15—20 de aminoacizi din cei 220 ai segmentelor

V_H şi V_L din molecula de imunoglobulină ar veni în contact cu antigenul. Situsul ar avea o suprafaţă de ~ 100 nm², ceea ce ar reprezenta mai mult de 1% din suprafaţa întregii molecule (~ 7 000 nm²).

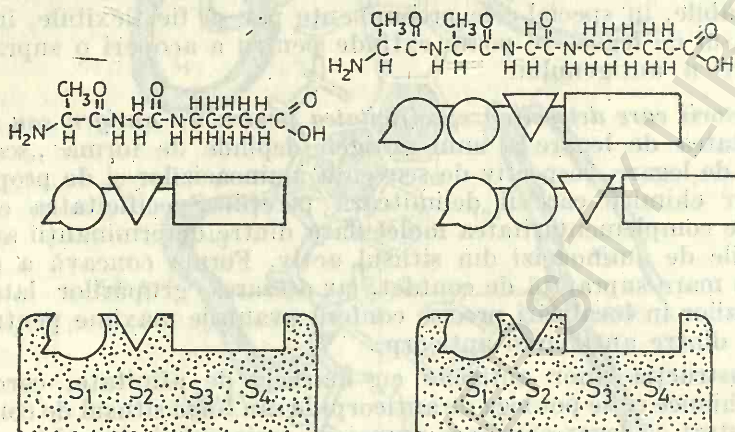


Fig. 31. — Reprezentare schematică a situsului de legare al anticorpului faţă de determinantul antigenic acid D-Ala-Gly-ε-aminocaproic. Situsul este format din patru subsitusuri (S1—S4), structurate pentru a lega următoarele porţiuni ale determinantului : S1, D-alanina, NH2-terminală, care conţine o grupare α-amino liberă ; S2, restul de glicocol ; S3 şi S4, acidul ε-aminocaproic-COOH terminal. A. Alinierea determinanţilor peptidului acid D-Ala-Gly-ε-aminocaproic pe situsul de combinare. B. Două modalităţi posibile de aliniere a compusului acid (D-Ala)₂-Gly-6-aminocaproic pe acelaşi situs (după Sela, 1969).

Structura complexului antigen — anticorp la nivel atomic. Recent, Amit, Poljak şi colab. (1986) au studiat structura tridimensională a complexului antigen — anticorp şi relaţia dintre cei doi reactanţi la nivel atomic. În acest scop, au utilizat tehnici de analiză cristalografică în raze X, cu o rezoluţie de 2,8 Å. Antigenul folosit a fost lizozimul din oul de găină, iar anticorpul, a fost înlocuit de fragmente Fab izolate din anticorpii specifici monoclonali (antilizozim), numite Fab D1.3. Ei au demonstrat existenţa unei suprafeţe extinse de contact, în care interfaţa dintre antigen şi anticorp are o arie de ~ 30 Å × 20 Å. Situsul de combinare al anticorpului are o suprafaţă neregulată, destul de extinsă, cu proeminenţe şi depresiuni, formate din grupările laterale ale aminoacizilor din regiunile hipervariabile (regiunile determinante de complementaritate, RDC) ale segmentelor V_H şi V_L. Toate cele şase RDC ale anticorpului interacţionează cu antigenul şi, în toate, 16 aminoacizi din structura antigenului (tabelul nr. 17) vin în contact strîns cu 17 resturi de aminoacizi din structura imunoglobulinei-anticorp (tabelul nr. 18).

Din aceste date rezultă că determinanţii antigenici recunoscuţi ai lizozimului sînt formaţi din două secvenţe de aminoacizi, îndepărtate una de alta, în ordine lineară, dar adiacente pe suprafaţa proteinei, datorită plierii catenei polipeptidice. Ele corespund resturilor de aminoacizi nr. 18—27 şi 116—129. Ca şi în cazul altor tipuri de interacţiune proteină — proteină, suprafeţele ce vin în contact prezintă complementaritate

geometrică în sensul că lanțurile laterale care proemină la unele sînt plasate în depresiunile altora. Legarea se face prin forțe Van der Waals,

Tabelul nr. 17

Numărul resturilor de aminoacizi din molecula de lizozim, aflate în contact cu anticorpul (după Amit și colab., 1986)

Resturi din molecula de lizozim	Resturi din Ig în contact (nr. și catena)	Resturi din molecula de lizozim	Resturi din Ig în contact (nr. și catena)
Asp 18	1 L	Lys 116	3 H
Asn 19	2 H, L	Gly 117	6 H
Arg 21	1 H	Thr 118	2 H
Gly 22	3 H, 1 L	Asp 119	2 H
Tyr 23	2 H	Val 120	1 H
Ser 24	1 H	Gln 121	1H, 4 L
Leu 25	1 L	Ile 124	2 L
Asn 27	1 H	Leu 129	1 L

Tabelul nr. 18

Resturile de aminoacizi din molecula de anticorp implicate în contactul cu lizozimul (după Amit și colab., 1986)

Resturile de pe anticorp		Resturile din lizozim în contact
Catena ușoară (L)		
RDC 1*	His 30	Leu 129
	Tyr 32	Leu 25, Gln 121, Ile 124
FR 2**	Tyr 49	Gly 22
RDC 2	Tyr 50	Asp 18, Asn 19, Leu 25
RDC 3	Phe 91	Gln 121
	Trp 92	Gln 121, Ile 124
	Ser 93	Gln 121
Catena grea (H)		
FR 1	Thr 20	Lys 116, Gly 117
RDC 1	Gly 31	Lys 116, Gly 117
	Tyr 32	Lys 116, Gly 117
RDC 2	Trp 52	Gly 117, Thr 118, Asp 119
	Gly 53	Gly 117
	Asp 54	Gly 117
RDC 3	Arg 99	Arg 21, Gly 22, Tyr 23
	Asp 100	Gly 22, Tyr 23, Ser 24, Asn 27
	Tyr 101	Thr 118, Asp 119, Val 120, Gln 121
	Arg 102	Asn 19, Gly 22

*RDC = regiunea determinantă de complementaritate (hipervariabilă)

** FR = regiunea cadru („Framework region")

intercalate printre legături de hidrogen. Numărul interacțiunilor de acest tip este de același ordin ca și în alte sisteme proteină — proteină și are

implicații similare pentru specificitatea și energetica moleculelor care interacționează.

Deși „potrivirea" la suprafața de contact dintre antigen și anticorp este remarcabil de bună, există și unele imperfecțiuni, sub forma unor spații „goale". Unul dintre acestea este ocupat de o moleculă de apă. În ansamblu, natura interacțiunilor dintre antigen și anticorp seamănă cu cea descrisă de Bolognesi și colab. (1982) în cazul proteazelor cu inhibitorii lor naturali.

Modificările conformaționale care apar după formarea complexului sînt mici și probabil sub limita capacității de detectare a tehnicilor analitice actuale. Aceasta pledează pentru ideea că forma situsului de combinare al fiecărei molecule de anticorp preexistă și, în esență, nu este alterată de legarea antigenului. De aceea, este sigur că, spre exemplu, modificarea unui singur aminoacid este conceptual netolerată, deoarece interferă steric cu procesul de legare. Studiul complexului antigen — anticorp la nivel atomic demonstrează că metafora clasică „lacăt și cheie" („lock and key"), propusă de Fischer (1894), precum și de Ehrlich (1900), folosită curent și în imunologia modernă datorită caracterului ei sugestiv, este o simplificare adecvată acestui tip de interacțiune. După toate aproximațiile, 20^{17} topologii diferite de suprafață ale situsului de combinare, respectiv 20^{17} tipuri de anticorpi cu specificități diferite, ar fi suficiente pentru a acoperi nevoile medii ale unui organism actual, în mediul înconjurător (Huber, 1986).

Landsteiner (1962) și Kabat (1968) au formulat următorul cadru conceptual general privind raporturile dintre antigene și anticorp, care stă la baza înțelegerii acestui proces:

1) Anticorpii sînt specifici pentru antigenul utilizat în producerea răspunsului imun. Această specificitate are la bază secvența diferită a aminoacizilor în catenele polipeptidice și structura tridimensională a anticorpilor.

2) Anticorpii pot lega sau nu, antigene înrudite structural cu antigenul care le-a dat naștere. Cînd leagă aceste antigene („reacții încrucișate") o fac cu energii de interacțiune obișnuit mult mai slabe pentru antigenul înrudit, decît pentru cel omolog.

3) Răspunsul umoral este în mod obișnuit heterogen: se produc mai multe clase și specii de Ig, chiar pentru un singur determinant antigenic. Afinitatea anticorpilor individuali pentru un determinant antigenic simplu îmbracă un spectru larg, deoarece în ser sînt numeroase tipuri de situsuri de combinare, complementare față de un singur determinant antigenic.

Recunoașterea preferențială a segmentelor mobile ale antigenelor proteice

Unele cercetări recente în curs de aprofundare vin în contrast cu teoria devenită clasică, după care anticorpii s-ar lega de forme rigide de pe suprafața antigenelor, așa cum o cheie se potrivește într-o broască. Ele au la bază studiul structurii proteinelor, prin tehnici de difracție cu raze X de înaltă rezoluție, care permit nu numai localizarea tuturor

atomilor în moleculă, ci și stabilirea „factorilor de temperatură", care, în esență, măsoară libertatea atomilor de a se mișca. Klug, van Regenmontel și colab. (1984) au stabilit o corelație strînsă între valorile factorilor de temperatură și localizarea determinanților antigenici în cazul proteinei capsidale a virusului mozaicului tutunului. Ei au evidențiat în structura acesteia prezența a 7 determinanți antigenici (formați din secvențe continue de 5—10 aminoacizi) și a unora formați din aminoacizi situați la distanțe mari în structura lineară a proteinei, dar apropiați prin plierea ei în spațiu (determinanți conformaționali).

Studiile efectuate pînă în prezent numai asupra determinanților continui au stabilit că șase dintre ei corespund unor regiuni din moleculă cu factori de temperatură ridicați, ceea ce indică o mai mare mobilitate a segmentelor respective. Mobilitatea aparține, după Klug (1984), „scheletului" moleculei de proteină și rezultă dintr-o deplasare de ~ 1 Å, în raport cu poziția lui medie. Mobilitatea joasă a celui de-al șaptelea determinant ar fi rezultatul unor constrîngeri artificiale, rezultate din poziția lui în cristal, unde este în contact cu o moleculă vecină. Eliberat de aceasta, el ar putea fi mobil.

Relația dintre mobilitatea determinantului antigenic și legarea de situsul de combinare al anticorpului a fost studiată și de Lerner și colab. (1984). Ei au pornit de la observația că anticorpii produși față de unele peptide sintetice (10—15 aminoacizi) sînt capabili să recunoască adesea proteina nativă intactă, din care secvența lor face parte în mod normal. Prin contrast, anticorpii induși de proteinele întregi reacționează slab sau deloc cu fragmentele peptidice. Explicația obișnuită este că peptidele respective pot lua în soluție cel puțin temporar o conformație corespunzătoare celei pe care o au în proteina naturală și, în consecință, pot da naștere unui anticorp care reacționează cu aceasta. Cercetările au fost efectuate pe 12 fragmente peptidice sintetice, corespunzînd unor segmente mobile sau rigide din structura miohementrinei, proteină purtătoare de O_2 la unele nevertebrate marine. S-a demonstrat că anticorpii induși față de segmentele peptidice mobile („calde", în terminologia lui Lerner) reacționează intens cu proteina întreagă, iar cei produși de segmentele rigide („reci") nu.

Cercetări similare efectuate pe alte proteine naturale (lizozim, mioglobină, hemoglobină, leghemoglobină, citocrom *c*, ribonuclează, insulină etc.) au confirmat faptul că segmentele peptidice expuse pe suprafața lor pot fi „calde" sau „reci", dar numai cele „calde" produc anticorpi care reacționează intens cu proteina intactă (Lerner, Tainer, Getzoff, 1984).

Aceste rezultate conferă o bază teoretică și practică importantă pentru selecționarea segmentelor peptidice ce trebuie utilizate la producerea vaccinurilor sintetice subunitare (vezi cap. „Vaccinurile viitorului"). Ele demonstrează că flexibilitatea segmentului respectiv al proteinei este mai importantă decît expunerea pe suprafața moleculei sau decît gradul de hidrofilie.

Lerner scoate în evidență diferența fundamentală dintre legarea enzimelor de substratul lor sau a hormonilor de receptorii lor și reacția antigen — anticorp. Mobilitatea implicată în legarea antigenului de anti-

corp este foarte localizată şi limitată la o singură acţiune, spre deosebire de modificările conformaţionale mari, repetate, corelate cu activarea sau inhibarea activităţilor enzimatice.

Studiul mai multor proteine, cu funcţii care au fost păstrate de-a lungul întregii lor istorii evolutive, au arătat că, în general, anticorpii recunosc acele porţiuni care s-au modificat în cursul evoluţiei şi nu pe cele conservate. În cazul citocromului *c*, animalele produc anticorpi, de preferinţă, faţă de regiunile care pot diferi de la o specie la alta, pentru că au devenit tolerante faţă de regiunile conservate şi nu le recunosc ca străine. Or, după cum a devenit evident, regiunile variabile corespund porţiunilor mai flexibile ale moleculelor, iar cele conservate-invariante, care îndeplinesc anumite funcţii specifice şi ca urmare trebuie menţinute în poziţii corecte, sînt cel mai adesea rigide.

Aceste descoperiri au o serie de implicaţii importante teoretice şi practice :

1) Mobilitatea unui determinant antigenic îi permite să se adapteze mai uşor într-un situs de legare preexistent al moleculei de anticorpi, deşi acesta nu a fost modelat pentru a se „potrivi" exact geometriei unei anumite molecule de proteină. Potrivirea nu trebuie să fie absolut perfectă. Flexibilitatea determinantului antigenic îi permite să se adapteze după anticorp şi anticorpul după antigen. După expresia lui Lerner, „unirea antigenului cu anticorpul seamănă mai mult cu întîlnirea dintre doi nori, decît cu cea dintre două pietre".

2) Legarea preferenţială a porţiunilor mobile din structura proteinelor furnizează un grad adiţional de diversitate în interacţiunile antigen — anticorp. Împreună cu celelalte mecanisme răspunzătoare de diversitatea anticorpilor (vezi cap. „Bazele genetice ale diversităţii anticorpilor"), fenomenul explică posibilitatea anticorpilor de a lega virtual orice tip de antigen existent sau care ar putea fi eventual creat prin sinteză chimică.

3) Mobilitatea unui segment din catena polipeptidică, asociată cu hidrofilia şi expunerea pe suprafaţa moleculei, reprezintă cel mai bun indicator pentru selecţia secvenţei ce trebuie folosită ca antigen pentru producerea vaccinurilor sintetice (Klug, 1984).

Multispecificitatea anticorpilor Richards şi colab. (1975) au arătat că deşi serurile imune par să fie foarte specifice sub raportul legării unui anumit antigen, Ig individuale pot să lege nu numai un număr de determinanţi antigenici diferiţi, dar chiar îi pot lega în regiuni diferite ale situsului de combinare. Numeroase probe biochimice şi biofizice demonstrează existenţa unor situsuri de combinare ale Ig, care participă cu specificitate egală în legarea unor haptene diferite structural. Ei le-au numit „regiuni de combinare polifuncţionale ale anticorpilor". Datorită lor, deşi moleculele de Ig au o structură tridimensională unică, se pot combina nu numai cu antigenul inductor, ci şi cu determinanţi antigenici similari (reacţii încrucişate) sau chiar cu structuri foarte diferite. Fenomenul este similar celui descris de Glazer (1970) pentru enzime, care pot lega molecule organice uneori foarte neînrudite ca structură cu substratul

enzimei, deoarece anumite particularităţi structurale sau funcţionale ale altor regiuni ale moleculei fac posibilă fixarea liganzilor la nivelul lor. După Richards şi colab. (1975), situsul de combinare al Ig ar avea o structură globală conferită de existenţa unor situsuri de legare multiple, datorită cărora există seruri imune ce pot lega mai mult de doi moli ai unei haptene mici per mol de Ig.

Se explică astfel rezultatele lui Hoffmeister şi Voss (1974), care, lucrînd cu haptene derivate de la N^{ε}-2,4-dinitrofenil lizină, au arătat că există seruri imune care leagă între 2,7 şi 4,1 moli de haptene per mol de Ig. Aceasta sugerează că situsul de combinare al Ig conţine subsitusuri, la nivelul cărora se pot lega determinanţi antigenici diferiţi structural. Lipsa de ,,potrivire" directă, totală, între antigen şi anticorp este compensată prin creşterea legării de altă regiune a situsului în aşa fel încît, deşi fiecare moleculă de Ig are o structură tridimensional unică, se poate combina cu un set de determinanţi antigenici diferiţi, care se pot ,,adapta" în moduri diferite în situs: anticorpii individuali sînt multispecifici (fig. 32). Cu toate acestea, serul imun (colecţia de Ig sintetizate sub acţiunea unui anumit antigen) se comportă în mod specific, reacţionînd normal numai cu antigenul inductor şi cu structuri foarte strîns înrudite.

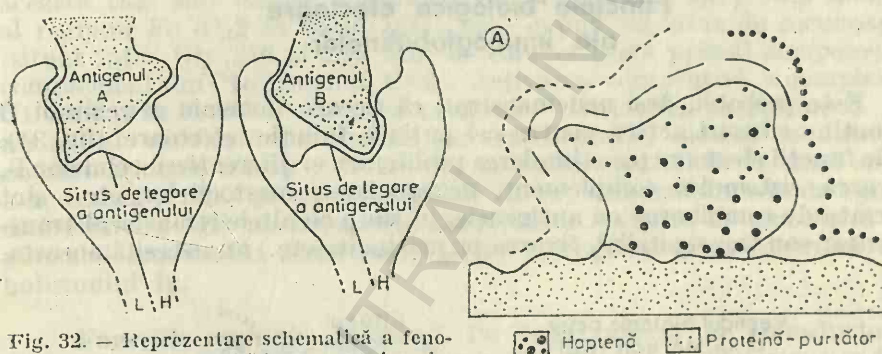


Fig. 32. — Reprezentare schematică a fenomenului de multispecificitate a unei molecule unice de anticorp (după Hood, 1984).

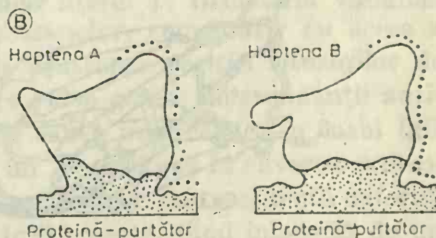


Fig. 33. — Multispecificitatea anticorpilor. A. Reprezentarea schematică a trei specificităţi diferite ale Ig capabile să interacţioneze cu aceeaşi haptenă. Liniile punctate, întrerupte şi continue, indică regiunile ce pot fi acoperite de situsurile de legare ipotetice ale unei molecule unice de Ig. B. Haptenele A şi B prezintă regiuni asemănătoare şi diferite, care explică acest fenomen.

Figura 33 explică acest paradox aparent prin faptul că diferitele părţi ale unui determinant antigenic, chiar o haptenă simplă, pot da naştere unui număr mare de situsuri de legare pe anticorpi individuali diferiţi, cu specificităţi diferite, de care se pot lega. Nu există nici o restricţie

pentru ca suprafețele evidențiate în figură să nu producă mai multe situsuri de legare complementare. Marea specificitate a imunității adaptative este, în ultimă instanță, o consecință a acestei diversități a situsurilor de legare pentru haptene și antigene. Un anticorp unic, oricare ar fi el, este specific numai pentru o anumită parte a haptenei sau a antigenului de care se leagă. Haptenele A și B au zone care seamănă mult și zone foarte diferite. Anticorpii produși față de zonele asemănătoare nu vor deosebi cele două haptene. Antiserul integral provenit de la un animal imunizat cu haptena întreagă legată de o moleculă-purtător conține anticorpi dirijați față de un număr mai mare de suprafețe diferite și de aceea le va deosebi cu certitudine, prezentînd o specificitate mai mare în reacțiile antigen — anticorp. Această heterogenitate a anticorpilor este dată deci de faptul că în cursul răspunsului imun se produc mai multe specii moleculare de Ig, fiecare capabilă să reacționeze cu antigenul inductor, dar, în același timp, fiecare moleculă de anticorp va diferi în spectrul de antigene diferite pe care le poate lega prin reacții încrucișate („cross-reactivity"). Multispecificitatea anticorpilor este un fenomen important deoarece amplifică diversitatea capacității de legare a antigenelor.

Funcțiile biologice efectoare ale imunoglobulinelor

Este probabil, deși nedemonstrat, că fiecare domeniu al regiunii C ar conține situsuri active pentru cel puțin o funcție efectoare (fig. 34). Unele funcții efectoare (ca stimularea proliferării și diferențierii celulelor B, activarea sistemului complement, degranularea mastocitelor etc.) sînt amorsate de combinarea cu antigenele, în timp ce altele (transferul transplacentar sau transepitelial, fixarea pe mastocite etc.) nu necesită aceasta.

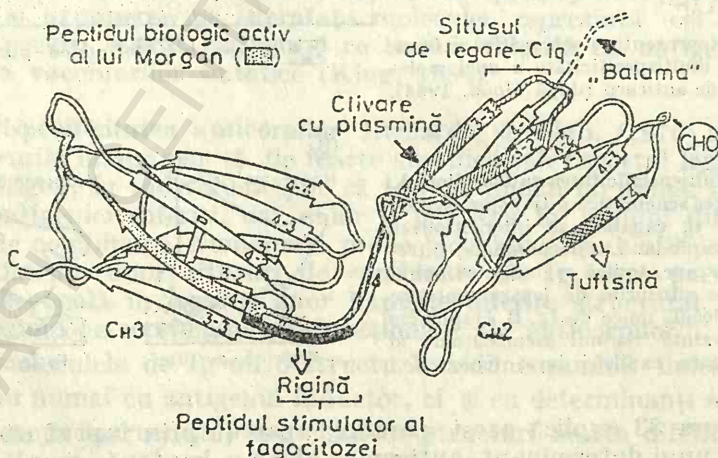


Fig. 34.—Model de structură a fragmentului Fc al IgG umane și al poziției peptidelor biologic active derivate de la Fc (după Putnam, Takahashi și Ishioka, 1985).

Funcțiile domeniului C-terminal (C_H3). Domeniul C_H3 este răspunzător de cele mai multe funcții citotrope ale IgG. Un rol major revine porțiunii notate cu acronimul PC — „piesa cozii" („tail-piece"), care există în două variante: *PCs* pentru Ig secretate și *PCm* pentru cele legate de membrane. Monocitele, macrofagele și polimorfonuclearele au receptori care recunosc anumite situsuri din regiunea Fc a IgG, fapt care permite legarea particulelor străine acoperite de aceste imunoglobuline și amorsarea procesului de fagocitoză. Se adaugă interacțiunile IgG cu celulele B, T și K. Astfel, unele celule K pot interacționa cu celulele străine acoperite cu IgG, pentru a produce liza de contact prin procesul denumit de *citotoxicitate dependentă de anticorpi, mediată celular*. Aceeași funcție asigură legarea IgE de mastocite și de bazofile. În cazul în care două molecule de IgE adiacente sînt reunite de un antigen se declanșează stimulul de activare a procesului de degranulare și de eliberare de amine vasoactive.

Activarea sistemului complement. Davies și Mertzger (1983) consideră că interacțiunea dintre antigene și anticorpi generează un semnal informațional, care este transmis regiunii Fc pe calea regiunii „balama" și pe calea interacțiunilor dintre domeniile laterale și longitudinale. Pe această cale sînt induse modificări conformaționale în primul domeniu al regiunii Fc (C_H2 în cazul IgG), care expun un situs de recunoaștere (situat între Gly 316 și Lys 340) de care se leagă primul component al complementului C1q (Burton, 1980). Activarea consecutivă a complexului C1 este urmată de declanșarea „cascadei" sistemului complement. Deși nu a fost verificată de studiile de cristalografie, ipoteza modificărilor conformaționale ale Ig este admisă de mulți specialiști. În mod similar s-ar realiza și alte funcții citotrope ale Ig, ca, de exemplu, cele de legare și dimerizare a IgE pe receptorii mastocitelor, urmate de amorsarea răspunsului anafilactic. Domeniul C_H2 ar fi implicat și în controlul catabolismului Ig.

Funcțiile regiunii „balama". Pe lîngă funcția de transductor de semnale informaționale, regiunea „balama" are un rol important în flexibilitatea Ig prin variația unghiului dintre fragmentele Fab. Ele pot trece reversibil de la forma literei Y la forma literei T. Geometria variabilă a Ig mărește eficiența de legare a antigenelor, comparativ cu aceea a unei molecule rigide, deoarece permite ajustarea poziției situsurilor de combinare, în funcție de distanțele la care se găsesc determinanții antigenici pe suprafața unei particule virale sau a unei celule. În cazul IgG și IgD, regiunea „balama" reprezintă un situs expus la clivarea proteolitică, cu producerea de fragmente Fab și Fc. IgA este rezistentă datorită structurii sale speciale, iar la IgM și IgE lipsește, fiind înlocuită de un domeniu suplimentar, care ar fi precursorul său evolutiv (Takahashi și colab., 1982).

Funcțiile componentei glucidice a Ig. Deși mult studiate în ultimii ani, cunoștințele asupra rolului glucidelor din structura Ig sînt limitate,

în aşa fel încît este mai uşor de spus ce nu fac, decît ceea ce fac efectiv (Baenziger, 1984). În general, li se atribuie următoarele funcţii :

1) realizarea şi/sau menţinerea unei conformaţii esenţiale pentru secreţia Ig ;

2) creşterea solubilităţii Ig ;

3) rol structural de „spaţiator" sau „distanţier" între domenii şi lanţuri ; în cazul IgG, spre exemplu, împiedică contactul dintre domeniile C_H1 şi C_H2 (Davies şi Metzger, 1983) ;

4) participarea în transducţia semnalelor de la Fab la domeniile Fc ;

5) participarea în unele funcţii efectoare, ca, de exemplu, în interacţiunile citotrope ale Ig, în legarea C1q etc. ;

6) rol în reglarea catabolismului prin protecţie faţă de degradarea proteolitică limitată, prima etapă a procesului de turnover al Ig şi prin coordonarea înglobării Ig de receptorii celulari (Putnam şi colab., 1985).

Producerea de polipeptide cu rol de imunoreglare. Experimental s-a demonstrat că regiunile Fc ale Ig pot fi clivate proteolitic cu producerea de fragmente biologic active, cu rol de reglare a răspunsului imun. Aceasta sugerează că unele activităţi imunoreglatoare atribuite iniţial regiunii Fc s-ar datora, în realitate, peptidelor eliberate prin clivarea IgG de către macrofage. Cele mai cunoscute peptide imunoreglatoare izolate sînt următoarele :

Rigina este un tetrapeptid cu secvenţa Gly-Gln-Pro-Arg, derivat din primele patru resturi ale domeniului C_H3 al IgG1. Este prezent la toate cele patru subclase de IgG în poziţiile 340—343 şi are rolul de stimulator al fagocitozei (Veretennikova şi colab., 1981).

Peptidul biologic activ, izolat de Morgan (1982), este situat în poziţiile 335—358 ale domeniului C_H3 la IgG1 umane. Are toate activităţile de imunoreglare atribuite domeniului intact şi capacitatea de a induce celulele B să secrete anticorpi. Martinez (1983) a sintetizat un decapeptid corespunzător aminoacizilor din poziţiile 335—344, cu rol de stimulator al fagocitozei la polimorfonuclearele neutrofile.

Tuftsina este un tetrapeptid cu secvenţa Thr-Lys-Pro-Arg, prezent în poziţiile 289—292 în domeniul C_H2 la toate subclasele de IgG umane. Are rolul de stimulator al fagocitozei.

Transmiterea placentară. Regiunea Fc a IgG mediază transferul transplacentar al celor patru subclase ale acestei Ig prin placentă (Jenkinson şi colab., 1976 ; McNabb, 1976). Wang şi colab. (1970) consideră că transferul placentar este selectiv şi că nu toate subclasele trec în mod egal în sîngele fetal. După datele lor, IgG2 s-ar găsi în sîngele fetal în concentraţii foarte mici sau chiar urme. După Shakib şi Stanworth (1980) însă, diferitele subclase de IgG se găsesc în serul nou-născuţilor în proporţii similare celor din serul adulţilor normali. Aceasta sugerează că

placenta nu are un rol activ în determinarea proporției subclaselor de IgG care trec în circulația fetală. Mellbye și Natvig (1973) consideră că IgG prezente la nou-născut nu sînt integral transferate de la mamă, deoarece ar exista o sinteză fetală de IgG *in utero*.

Imunoglobulina M

IgM este produsă sub două forme: monomeră, legată de membrane, și polimeră, liberă în ser. Are drept caracteristică prezența unui lanț greu μ (g.m. ~ 70 000 dal), format din 576 de aminoacizi, dintre care 452 reprezintă regiunea constantă. Fiecare unitate de bază (Ig monomeră) conține 5 grupări prostetice oligozaharidice, legate de lanțul μ: una în Cμ1, trei în Cμ3 și ultima legată de restul de aminoacid al „piesei cozii". Lanțurile H legate de membrană (μm) și cele secretate (μs), care au fiecare cîte patru domenii, diferă prin structura regiunii COOH-terminale, fapt care explică atît localizarea membranară, cît și gradul diferit de agregare.

IgM de membrană (IgMm)

Pe lîngă structura generală a IgM, are o secvență carboxiterminală hidrofobă, formată din 41 de aminoacizi, care are rolul de a întrerupe transportul lanțurilor μm prin membrană, ancorînd Ig în structura acesteia; 26 de aminoacizi din această secvență formează o α-helice, din care 24 corespund porțiunii transmembranare. Ea este flancată la exterior de un grup de resturi acide pe fața externă a membranei și de un grup de resturi bazice pe cea citoplasmatică, necesari pentru a ancora Ig în stratul dublu lipidic.

IgM serică (IgMs)

Avînd un caracter suficient de hidrofil pentru a circula ca moleculă solubilă, are structura unui pentamer, cu formula (L2 μ2)5 și g.m. ~ ~ 950 000 dal, de unde și numele de macroglobulină atribuit în trecut. Lanțul μs are un segment terminal hidrofil de 20 de aminoacizi, care îi permite să traverseze complet membrana celulară în cursul sintezei. Fiecare pentamer conține un lanț polipeptidic J (~ 20 000 dal), foarte acid, bogat în cisteină, cu rol în polimerizarea subunităților. El este legat în cursul polimerizării printr-o punte S—S, cu un rest penultim de cisteină prezent în structura „cozii" μs. Cele cinci subunități monomere sînt aranjate radiar, cu regiunile Fc orientate spre centru și cu fragmentele Fab spre exterior, fiind unite la nivelul regiunii C-terminale, printr-o punte S—S, formată între domeniile CH_3 și lanțul J, de la care se îndepărtează radiar. IgMs apare la microscopul electronic ca o stea cu 5 brațe, fiecare avînd formă de Y, dispuse în jurul unui disc central (vezi fig. 26).

În anumite imagini, „ramurile" pot lua orientări diferite unele față de altele în același plan ca și în planuri diferite față de cel al regiunii centrale. Diametrul total al moleculei este de ~ 30 nm. Fiecare ramură

are 12,5 × 3,0 nm; Ø intern al inelului central este de 4,0 nm, iar cel extern de ~ 10,0 nm. Modificările de poziţie ale ramurilor sugerează atît existenţa unei regiuni „balama" pe fiecare subunitate (respectiv pe fiecare ramură), dar şi la nivelul articulării lor de discul central. Studiile de dispersie optică rotatorie sugerează că cele 5 subunităţi ale IgM ar fi relativ independente unele de altele, conferind ansamblului o mare flexibilitate, care facilitează legarea regiunilor Fab de puncte multiple.

Funcţiile IgM. IgMm funcţionează ca receptor major pentru antigene pe suprafaţa celulelor B, la care se găseşte ca lanţuri μ în citoplasmă în stadiul pre-B şi ca IgMm-receptor pe celulele Bμ virgine (la sfîrşitul etapei de diferenţiere independentă de antigen).

IgMs are funcţii aglutinante, fiind de ~ 1 000 de ori mai eficientă pe bază molară decît anticorpii monomeri bivalenţi (Hood şi colab., 1984).

Activează complementul cînd C1q se leagă de complexul Ag — AcIgM. Ca urmare, după legarea de antigenul — „ţintă", stimulează distrugerea litică de către complement, ca şi ingestia de către macrofage, fapt care o fac deosebit de utilă în apărarea faţă de microorganisme invadatoare (bacteriemii). Deşi afinitatea fiecărui situs activ pentru un antigen poate fi slabă, aviditatea globală a IgMs este mare, în special faţă de antigenele complexe şi faţă de celule, din cauza grupărilor antigenice repetate ale acestora. IgM apar foarte precoce la nou-născut, ca şi în cursul răspunsului imun, respectiv la ~ 3 zile după administrarea antigenului, ating maximum după 5—6 zile şi sînt înlocuite spre ziua a 10-a de IgG. Datorită dimensiunilor mari, trec foarte greu sau deloc prin placentă sau în lichidele interstiţiale.

IgM reprezintă forma sub care se găsesc anticorpii naturali ai grupelor sanguine.

Pe baza datelor imunochimice se consideră că IgM reprezintă clasa de Ig cea mai bine conservată în cursul evoluţiei.

Imunoglobulina A

Ca şi în cazul altor imunoglobuline, unitatea de bază a IgA este alcătuită din două catene grele specifice de clasă (Hα) şi două catene uşoare (2λ sau 2k).

IgA are însă o tendinţă evidentă de a produce polimeri, cu constantele de sedimentare 10S, 13S, 15S şi 17—18S, care corespund (în cantităţi progresiv descrescînde) unor di-, tri-, tetra- sau pentamere. Pe microelectronografii, IgA murine şi umane apar ca monomeri, avînd forma literei Y, sau ca dimeri (două litere Y), legate în mod rigid pe aceeaşi axă prin extremitatea COOH-terminală a catenelor grele. Cele două fragmente Fc formează un ax lung de 12,5 nm, iar fiecare fragment Fab apare ca un braţ lung de 7,0 nm, orientat diferit în raport cu Fc (fig. 35).

sIgA umană apare cu trei braţe, sugerînd că cele două IgA monomere ar fi suprapuse, închizînd componentul secretor ca într-un sandwich (J. F. Bach, 1976).

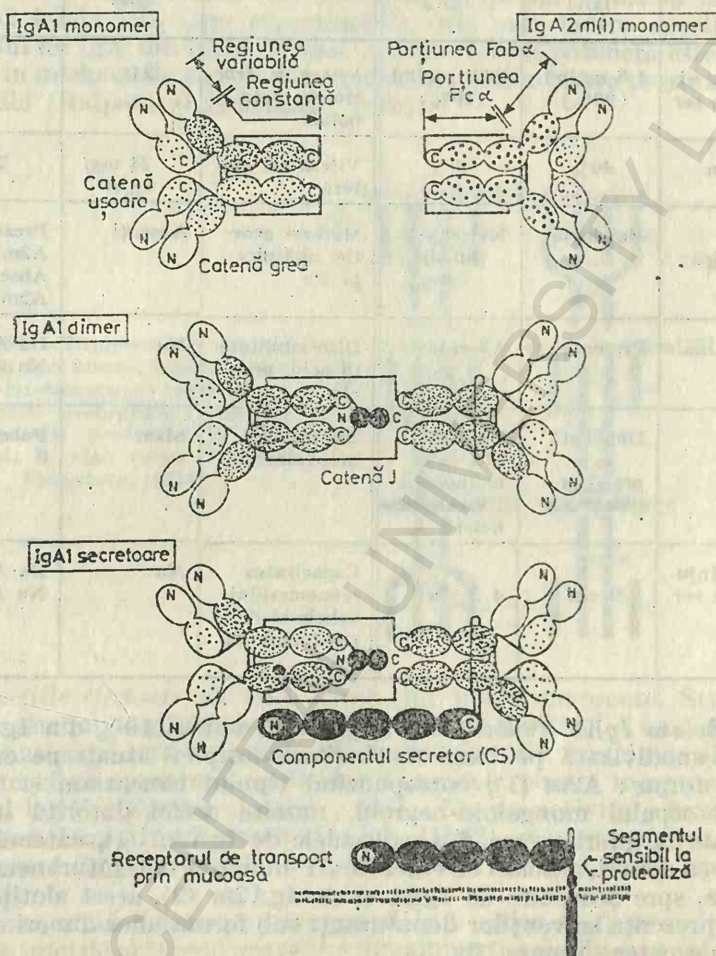


Fig. 35. — Structura covalentă a IgA umane monomeră, dimeră şi secretoare. Fiecare formaţiune eliptică mare reprezintă un domeniu al moleculei (după Underdown şi Schiff, 1986).

Subclasele de IgA. Pe baza unor diferenţe multiple (antigenice, numărul punţilor S—S, structura regiunii balama, conţinutul în galactozamină etc.) au fost descrise două clase de IgA (tabelul nr. 19), notate IgA1 şi IgA2 (Feinstein şi Franklin, 1966).

Subclasa IgA1 formează ~ 90% din IgA serică şi este în proporţie de 80% monomeră. În structura ei, catenele L şi H sînt reunite prin două punţi S—S.

Tabelul nr. 19

Caracteristicile subclaselor de IgA (modificat după Tomasi Jr., 1984)

	IgA1	IgA2		IgA1	IgA2
Concentraţia şi proporţia în ser	1,8 mg/ml (90%)	0,22 mg/ml (10%)	Viteza de fracţionare catabolică	24%	34%
Proporţia în lapte	40%	60%	Viteza de sinteză	24 mg/kg/zi	21,3 mg/kg/zi
Mobilitatea electroforetică la pH 8,6	Mai lentă	Mai rapidă (anod)	Markeri genetici alotipici pe Fc	Absenţi	Prezent A2m (1) Absent A2m (1)
Galactozamina	Prezentă	Absentă	Disociabilitate în acid, uree etc.	Nu	Da A2m(1) Nu A2m(2)
Regiunea „balama"	Duplicată + prezenţa glucidelor	Lipsa a 12–13 aminoacizi Lipsa glucidelor	Interacţiuni necovalente	Slabe	Puternice
Timpul de înjumătăţire în ser	5,9 zile	4,5 zile	Capacitatea monomerului subclasei de combinare cu CS	Nu	Da A2m(1) Nu A2m(2)

Subclasa IgA2 umană, care reprezintă numai 10% din IgA serică, poate fi subdivizată pe baza markerilor alotipici situaţi pe catena H, în două forme: A2m (1), corespunzînd tipului caucazian, şi A2m (2), respectiv tipului mongoloid-negroid, numite astfel datorită incidenţei lor variate la diferite rase. La moleculele de IgA2m (1), catenele L sînt prezente ca dimeri, asociaţi cu catenele H numai prin legături necovalente. De aceea, spre deosebire de IgA1 şi de IgA2m (2), acest alotip se disociază în prezenţa solvenţilor denaturanţi sub forma unor dimeri de catene grele şi de catene uşoare (fig. 36).

După Underdown şi Schiff (1986), diferenţa cea mai notabilă între IgA1 şi IgA2 ţine de structura regiunii „balama". În timp ce în cazul catenelor Hγ ale IgG, regiunea „balama" este codificată de exoni separaţi în structura genelor, la IgA este codificată de începutul exonului pentru domeniul constant mijlociu (C α2) al catenei Hα. În cazul IgA1, regiunea „balama" include o secvenţă duplicată de 8 aminoacizi, bogată în prolină, de care sînt legate 5 oligoglucide. La IgA2, această regiune este înlocuită de o secvenţă scurtă de resturi de prolină dispuse succesiv. În timp ce la alte Ig regiunea „balama" este un situs privilegiat pentru proteoliză, la IgA el este rezistent. Ca urmare, la această Ig, proteoliza este realizată doar de proteaze specializate. Diferenţa de lungime şi de

structură chimică a regiunii balama a celor două subclase de IgA ar putea fi consecinţa presiunii selecţiei exercitate de microorganisme care secretă proteaze cu specificităţi diferite. Imunoglobulina A este prezentă în două forme : IgA serică este prezentă în special în formă monomeră (g.m. 162 kdal; 7S), care reprezintă la cele mai multe specii ~ 85% din totalul de IgA din serul normal. La om, forma polimeră este întîlnită frecvent în mieloamele cu IgA, dar gradul de polimerizare prezintă variaţii individuale (Halpern şi Koshland, 1970).

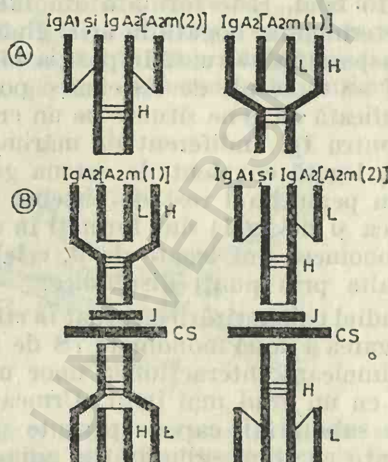


Fig. 36. — Reprezentare schematică a IgA umană. Liniile subţiri care interconectează barele groase (catenele polipeptidice) reprezintă punţile disulfidice. A. IgA serică. B. sIgA (după Wang şi Fudenberg, 1974).

Funcţiile efectoare ale IgA serică sînt puţin cunoscute. Studiul lor a fost, în general, neglijat, deoarece sînt greu de purificat şi au o activitate slabă ca anticorpi faţă de antigenele introduse prin imunizare sistemică. IgA au un efect opsonizant slab, deşi fagocitele poartă receptori pentru segmentul lor Fc (Fanger şi colab., 1981). Nu au activitate fixatoare de complement. După Pfaffenbach şi colab. (1982), pentru a activa eficient complementul IgA au nevoie de participarea unui anticorp aparţinînd altui izotip.

La om, rolul fiziologic principal al IgA serice ar fi de a îndepărta cantităţile mici de antigene provenite din alimente sau din microorganisme, absorbite în circulaţia generală. Această funcţie este importantă, deoarece eliminarea antigenelor absorbite împiedică accesul lor la celulele sistemului imunitar şi stimularea unui răspuns imun mai extins, care ar devia resursele de apărare de la funcţia lor normală de protecţie antiinfecţioasă (Walker şi Block, 1983). În sfîrşit, după Bienenstock şi Befus (1983), IgA din ser ar putea lega antigenele din sînge, transportîndu-le înapoi în mucoase, după legarea de componentul secretor şi transcitoză asociată cu acesta.

IgA secretoare

Prezentă în diferite secreţii la suprafaţa mucoaselor (de unde şi denumirea improprie), IgA secretoare („Secretory IgA", sIgA) apare esenţial în formă dimeră (~ 80%) şi numai parţial ca monomer sau alt tip de polimer.

IgA dimer are formula generală ($(IgA)_2 \bullet J \bullet CS$), cu g.m. 390 kdal (11S) şi este alcătuită din două IgA monomere (în special IgA_2) la care se adaugă catena J şi un component secretor (CS). Particularităţile fizico-chimice ale sIgA îi conferă proprietăţi speciale ca rezistenţă mare la proteoliză, comparativ cu alte Ig, datorită structurii catenei H, conformaţiei speciale a moleculei după legarea catenei J şi a componentului secretor, capacităţii lor de a se lega de mucine şi de a modifica proprietăţile reologice ale mucoaselor.

Catena J (engl. join = a uni) este un glicopeptid neobişnuit, cu g.m. 15 kdal. Este formată din 129 de aminoacizi, a căror secvenţă a fost determinată, bogată în acizi glutamic şi aspartic şi un oligozaharid legat de asparagină, situată în poziţia 43 (Brown şi colab., 1977). Catena J conţine 7—8 molecule de cisteină şi poate fi diferită de la o Ig la alta. Este codificată de gene situate pe un cromosom diferit de cei care conţin genele pentru Ig. Indiferent de mărime, IgA polimere conţin o singură catenă J, legată covalent de catena grea α (sau de catena $H\mu$ în cazul IgM) prin penultimul rest de cisteină carboxiterminală. Polimerii înalţi de IgA (ca şi de IgM) sînt formaţi în aşa fel încît numai două molecule de Ig monomere sînt legate de J, celelalte subunităţi fiind legate direct una de alta prin punţi disulfidice.

Studiul polimerizării efectuat *in vitro* în cazul IgM a confirmat aceste date. Legarea a două monomere 7S de o catenă J şi formarea unui dimer stabil stimulează interacţiunea unor unităţi adiţionale, pentru a forma polimeri cu un grad mai înalt. Urmează apoi o alterare a conformaţiei celorlalte subunităţi, care le permite să interacţioneze direct, prin forţe necovalente ce aduc subunităţile adiacente în strînsă apropiere, pentru a forma punţi S—S între ele, fără participarea catenei J (Tomasi Jr. şi Plaut, 1985). Polimerizarea nu se realizează cum s-a crezut iniţial prin formarea unei serii de punţi disulfidice secvenţiale, ci de către o enzimă legată de membranele celulare, prezentă şi în celulele B activate (nu însă şi în cele aflate în repaus). Sulfhidril-oxidaza catalizează polimerizarea Ig prin oxidarea directă a catenei J şi a sulfhidrililor din molecula de IgM la care a fost studiată (Roth şi Koshland, 1981). Polimerizarea este un proces controlat, intracelular.

IgA polimeră are o specificitate antigenică proprie, absentă la forma monomeră, decurgînd din configuraţia specifică a polimerului (Apicella şi Allen, 1970). Celulele producătoare de IgG sau IgD la nivelul mucoaselor sintetizează şi ele catene J, care nu sînt însă folosite ca în cazul IgA sau IgM, ci degradate în citoplasma plasmocitelor respective.

Polimerizarea are o importanţă fundamentală pentru activitatea sIgA, deoarece este esenţială pentru transportul acestora pe suprafaţa mucoaselor, măreşte aviditatea pentru antigene şi creşte rezistenţa la digestia proteolitică.

Componentul secretor („Secretory Component", CS) este o β-globulină neînrudită cu Ig, bogată în glucide ($\sim 8,7\%$), avînd o compoziţie caracteristică în aminoacizi. Este sintetizat pe polisomii legaţi de membrane ai reticulului endoplasmatic rugos (RER) ca proteine integrate transmembranare (g.m. $\sim 70-95$ dal).

Este format din 733 de aminoacizi a căror secvenţă este cunoscută şi conţine trei domenii distincte : a) citoplasmatic, avînd 103 aminoacizi ; b) intramembranar, format din 23 de aminoacizi hidrofobi ; c) ectoplasmatic, avînd 629 de aminoacizi, cărora li se adaugă o secvenţă „semnal" de 18 aminoacizi (Mostov, Kraehenbuhl şi Blobel, 1984). Porţiunea extracelulară este alcătuită din 5 domenii, avînd fiecare 110—115 aminoacizi. Funcţia ei este de receptor pentru transportul transepitelial, deoarece leagă Ig polimere (IgA şi IgM) care conţin lanţul J.

Nu se cunoaşte precis raportul CS cu moleculele de IgA. După modelul lui Heremans (1974), componentul secretor „s-ar înfăşura" în jurul regiunii Fc a dimerului de IgA, extinzîndu-se de la o regiune „balama" la alta, fapt care măreşte stabilitatea moleculei şi rezistenţa la proteoliză, mascînd, totodată, şi unii determinanţi antigenici ai Ig (fig. 37).

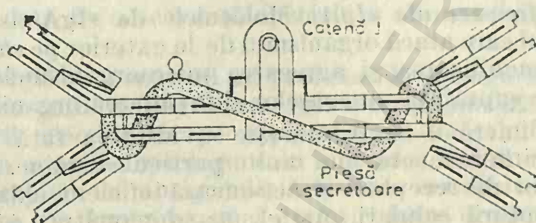


Fig. 37. — Structura IgA1 secretoare (sIgA1) umană. Componentul secretor este, probabil, înfăşurat în jurul dimerului de IgA şi legat prin punţi disulfidice de domeniul Cα2 al fiecărui monomer. Catena J participă la legarea celor două subunităţi (după Roitt, Brostoff şi Male, 1985).

Componentul secretor este sintetizat în celulele epiteliale din acini şi glandele salivare, mucoasa căilor respiratorii, digestive, biliare, vezicale, glandei mamare, pancreasului, uretrei, colului şi trompelor uterine etc. După „prelucrare" în complexul Golgi (inclusiv prin adăugarea glucidelor terminale), migrează pentru a fi integrat în plasmalema bazală şi laterală a celulelor epiteliale ale mucoaselor sau în membrana sinusoidală a hepatocitelor. Sinteza CS este independentă de IgA. Dovadă este faptul că CS apare la nou-născuţi în săptămîna a 8-a (înainte de apariţia plasmocitelor) şi este prezent şi la bolnavii cu agamaglobulinemie sau fără IgA în secreţii.

Componentul secretor acţionează prin domeniul său ectoplasmatic ca receptor pentru complexul (IgA)2 • J, facilitînd transportul IgA dimer prin celulele epiteliale, pentru a fi secretat în lumenul glandelor şi în canalicule. Numărul receptorilor per celulă secretoare umană este apreciat foarte diferit, între 260 şi 7 000, iar după Socken şi colab. (1979), la 20 000. Aceste diferenţe mari sînt determinate de numărul moleculelor de CS-receptor neocupate la un moment dat.

Rolul CS în transportul sIgA a fost demonstrat experimental : 1) anticorpii IgG, anti-CS purificaţi cu afinitate de legare pentru receptori, se leagă la nivelul acestora şi suferă un transport limitat prin celulă ;

2) dintre celulele de carcinom de colon clonate, singurele capabile să lege IgA sînt cele la care s-a putut evidenţia prezenţa CS pe suprafaţă prin tehnici de fluorescenţă.

Rolul CS în transportul IgA este demonstrat şi de faptul că bolnavii cu deficit de CS nu au sIgA în secreţii sau au numai cantităţi foarte limitate, deşi nivelul IgA seric este normal.

Componentul secretor măreşte rezistenţa sIgA, în special, la tripsină şi chemotripsină, protejînd-o de degradarea intracelulară în timpul transportului şi de cea extracelulară în secreţiile mucoaselor. Transportul transcelular al sIgA este asociat cu o pierdere continuă de receptori (CS), care, spre deosebire de alţi receptori, după endocitoză nu sînt recirculaţi la suprafaţa mucoasei. Compensarea acestei pierderi necesită, după Linderdown şi Schiff (1986), sinteza a 30 µg proteină CS/oră$^{-1}$/per gram de ţesut. Este probabil că evoluţia a creat şi un al doilea mecanism de minimalizare a pierderii receptorilor CS, făcînd ca endocitoza lor să aibă loc numai cînd sînt legaţi de molecule de IgA.

Funcţiile efectoare ale sIgA. Moleculele de sIgA asigură protecţia de agenţi patogeni care atacă organismul de la exterior pe calea mucoaselor. Ele realizează imobilizarea şi agregarea microorganismelor, împiedicînd deplasarea lor pe suprafaţa mucoaselor şi invadarea organismului.

Natura polimeră a sIgA măreşte aviditatea faţă de antigene şi capacitatea de a interconecta mai multe particule străine. sIgA blochează legarea virusurilor de receptori şi acţionează eficient chiar după legarea acestora de receptorii celulari. Astfel, s-a demonstrat că virusul gripal legat de receptorii celulari, asociat cu IgG, pătrunde în celulele sensibile şi se localizează în nucleu, unde iniţiază replicarea. Acelaşi virus, legat de sIgA, continuă să se lege de celulele sensibile, dar internalizarea lui este stopată.

sIgA minimalizează efectul toxinei holerice, probabil împiedicînd legarea subunităţii B de celulele epiteliului intestinal. Capacitatea sIgA de a participa direct la omorîrea microorganismelor invadatoare este controversată.

Unele date pledează pentru un rol semnificativ în reacţiile de citotoxicitate mediate celular – dependente de anticorpi (ADCC) (Underdown şi Schiff, 1986).

Imunoglobulina E

IgE, izolată şi caracterizată de Ishizaka şi Ishizaka (1966), are o structură monomeră (g.m. 196 000 dal; 8,2 S) şi este formată din două lanţuri uşoare identice cu cele întîlnite la alte Ig şi două lanţuri grele caracteristice (ε) (fig. 26). Lanţul Hε are g.m. 72 500 dal, din care 61 000 dal corespund părţii polipeptidice şi este format din 550 de aminoacizi, organizaţi în 5 domenii, dintre care patru sînt localizate în regiunea constantă şi unul în regiunea variabilă (Joke şi Capra, 1984). Cele două lanţuri H sînt reunite prin două punţi disulfidice localizate de o parte şi de alta a domeniului Cε2.

IgE conţin pînă la 11,7% glucide. Încălzirea la 56°C îi inactivează activitatea citotropă, prin denaturarea determinanţilor antigenici din domeniile $C\varepsilon 3$ şi $C\varepsilon 4$, care par să fie domeniile cele mai importante pentru funcţia IgE.

Sînt prezente în sînge în concentraţii extrem de mici ($\sim$ 250 ng/ml de ser sau 0,004% din totalul Ig). Celulele care sintetizează IgE au fost evidenţiate mai ales în mucoasele respiratorii, gastrointestinale şi în ganglionii regionali (Tada şi Ishizaka, 1970). Timpul de înjumătăţire al IgE circulante este de $\sim$ 4 zile, iar al celor fixate de 7—13 zile.

Funcţiile IgE. Rolul fiziologic al IgE (*E* de la *e*ritem) nu este cunoscut, deşi, după unele date, ar reprezenta măcar o parte din mecanismele imunitare de îndepărtare a unor helminţi din intestin la oaie, iepure şi şobolan. Acţiunea s-ar exercita prin intermediul unor mediatori, care atrag eozinofilele şi prin expulzarea paraziţilor din organele ce conţin muşchi netezi care se contractă rapid şi prelungit. Activitatea biologică a IgE nu este dată de o secvenţă specială a aminoacizilor, ci de conformaţia moleculei.

Asocierea IgE cu receptorii săi pare stabilă şi asigură în mare măsură protejarea anticorpului de degradare. IgE interacţionează prin fragmentul Fc cu receptorii specifici de pe suprafaţa mastocitelor şi a bazofilelor provenite de la speciile omologe sau înrudite, lăsînd fragmentele Fab libere să se combine cu antigenele. Activarea monocitelor sau a bazofilelor ar rezulta din formarea unei „punţi'' între două molecule de IgE adiacente, combinate cu un antigen multivalent, urmată de apropierea şi imobilizarea receptorilor specifici. În acest fenomen, IgE ar avea un rol pur pasiv, de a permite reunirea („dimerizarea'') receptorilor, care ar fi sursa efectivă a semnalului de activare. Ca urmare, s-ar declanşa semnalul de amorsare a degranulării celulelor respective şi a eliberării de mediatori farmacologic activi, de tipul histaminei, serotoninei, leucotrienelor, de substanţe din grupul SRSA („*S*low *r*eacting *s*ubstances of *a*naphylaxis'', ca D4, E4, C4), precum şi a unui factor chemotactic pentru eozinofile, care se acumulează, se leagă de paraziţi şi îi lezează (Dessaint şi Capron, 1980).

Prin aceste fenomene, IgE sînt implicate în reacţiile de hipersensibilitate imediată de tip anafilactic la numeroase specii, inclusiv la om. Concentraţia lor în ser creşte în alergii şi parazitoze, putînd ajunge la 1 500 ng/ml în astmul alergic şi la o medie de 2 700 ng/ml în dermatita atopică, iar în cazuri extreme, chiar la 31 000 ng/ml (Binaghi, 1973).

Imunoglobulina D

Izolată iniţial de la un caz de mielom atipic, IgD a fost găsită ulterior în cantitate mică (0,2% din Ig totale) şi în sînge. Are structura de Ig monomeră, în care lanţul δ uman, alcătuit din 3 domenii, are o regiune constantă, formată din 383 de aminoacizi (fig. 26). Regiunea „balama'', situată între $C\delta 1$ şi $C\delta 2$, care are 64 de aminoacizi (cea mai

lungă descrisă), conține un segment implicat în interacțiunea cu celulele B, T și cu macrofagele. IgD este relativ sensibilă la degradarea termică și proteolitică.

Funcțiile IgD. Are rol de receptor de antigen pe suprafața limfocitelor B mature (Bμ + δ). Moleculele de IgM și IgD prezente pe suprafața aceleiași celule B au aceeași specificitate, deoarece au situsuri identice de legare a antigenului. Nu se cunoaște mecanismul diferențierii de la stadiul Bμ la Bμ + δ și nici dacă este dependent de stimularea de către antigenul corespunzător. IgD are activitatea de anticorp față de anumite antigene ca toxina difterică, antigenele nucleare și tiroidiene, insulină, penicilină și proteina din lapte (Hood și colab., 1984).

Reacţiile antigen — anticorp

„Cînd un antigen sau o substanţă străină se combină cu o moleculă de anticorp, o face la un situs în care se potrivesc precis, aşa cum un lacăt se potriveşte cu o cheie"

J. D. Capra, A. B. Edmundson

Reacţiile antigen — anticorp reprezintă materializarea uneia dintre proprietăţile esenţiale ale Ig, respectiv a capacităţii de a recunoaşte determinantul antigenic care a dirijat formarea lor, de a interacţiona cu acesta şi de a produce o serie de manifestări evidente (precipitare, aglutinare etc.). Reacţiile antigen — anticorp au fost mult studiate, datorită aplicaţiilor lor practice, decurgînd din marea lor specificitate.

În realitate, la o analiză fină, antiserurile şi chiar anticorpii sînt mai puţin specifici decît ne-am aştepta, deoarece cele mai multe antigene sînt macromolecule multiantigenice. Chiar cînd structura lor este cunoscută, natura, numărul şi localizarea grupărilor funcţionale pe fiecare moleculă, sînt greu de determinat.

Cele mai multe date privind natura reacţiilor antigen — anticorp au fost realizate cu ajutorul haptenelor. Acestea au avantajul de a nu fi imunogene şi de a purta uneori o singură grupare determinantă de specificitate sau cel mult un număr foarte limitat, dar au capacitatea de legare specifică a anticorpilor, esenţială în aceste reacţii. După Berzofsky şi Berkower (1984), principiile fundamentale care stau la baza interacţiunii dintre antigene şi anticorpi sînt cele ale oricărei reacţii bimoleculare. Legarea antigenelor cu anticorpii poate fi, în general, descrisă prin aceleaşi teorii şi abordată experimental în acelaşi mod ca şi legarea unei enzime de substratul său sau a unui hormon de receptorul propriu de pe celule. Ei scot însă în evidenţă unele particularităţi proprii reacţiilor antigen — anticorp.

1) În principiu, cel puţin , aceste reacţii sînt totdeauna reversibile. Anticorpii nu alterează ireversibil antigenul, aşa cum modifică o enzimă substratul de care s-a legat.

2) Reacţiile antigen — anticorp pot fi considerate ca un prototip pentru interacţiunile macromoleculare, în general. Acest caracter decurge din faptul că, spre deosebire de enzime, experimental poate fi produs orice tip de anticorp, corespunzător oricărei substanţe cunoscute, cu specificitate şi afinitate la fel de mare ca a enzimelor pentru substratul lor sau ca a hormonilor pentru receptori.

3) Dificultatea majoră în comparaţia cu enzimele decurge din heterogenitatea anticorpilor. Chiar antigenele înalt purificate conţin unele impurităţi, astfel încît, în cursul imunizării, animalele produc cantităţi

disproporţionat de mari de anticorpi faţă de astfel de impurităţi. În acest sens, Marrack (1963) citează experienţele lui Munoz şi Becker (1950), care, imunizînd animalele cu ovalbumină recristalizată de cîteva ori, au produs un antiser ce forma cinci benzi de precipitare cînd era testat prin difuzie în gel faţă de antigenul respectiv. Aceasta demonstrează că anticorpii dintr-un antiser imun, specific pentru un anumit antigen, reprezintă, în realitate, un amestec heterogen de molecule, cu specificitate fină diferită, aparţinînd unor subclase diferite şi cu capacitate de a deosebi antigenele prin reacţii încrucişate. Cu toate acestea, antiserurile imune sînt folosite curent în practică şi au chiar o serie de avantaje.

Tipul de reacţie observat depinde de starea fizică a antigenelor (solubil sau particulat) şi de condiţiile experimentale. Dacă antigenul este o proteină solubilă, legarea cu anticorpii în condiţii adecvate determină formarea unui complex antigen — anticorp insolubil (precipitat). Dacă determinanţii antigenici sînt legaţi pe suprafaţa unei particule sau celule (bacterii, hematii etc.), moleculele bivalente de anticorpi formează punţi între ele şi determină aglutinarea.

Tipurile de reacţii antigen — anticorp

Reacţiile antigen — anticorp pot fi grupate în trei categorii, în funcţie de natura interacţiunilor pe care le ilustrează:

1) *Reacţiile „primare"* reflectă interacţiunile iniţiale, de legare a antigenului de anticorpi, independent de fenomenele biochimice sau biologice care pot decurge din producerea lor. După J. F. Bach (1976), sînt reprezentate de: dializa la echilibru, extincţia fluorescenţei, imunofluorescenţa şi dozarea radioimunologică. Ele evaluează simultan cantităţile şi afinitatea anticorpilor.

2) *Reacţiile „secundare"* ilustrează fenomenele ce pot apărea *in vitro*, ca o consecinţă directă, dar nu obligatorie a interacţiunilor primare. Interacţiunile secundare sînt evidente după o perioadă variabilă de timp şi reflectă particularităţile de reacţie ale anumitor anticorpi. În această categorie intră: reacţiile de precipitare şi aglutinare, de neutralizare a toxinelor sau a virusurilor, precum şi reacţiile dependente de complement, ca, de exemplu, citoliza imună, imunofagocitoza şi chimiotactismul specific.

3) *Reacţiile „terţiare"* exteriorizează consecinţele biologice ale interacţiunilor primare *in vivo*. Ele au un caracter mai complex decît reacţiile secundare, deoarece condiţiilor de variabilitate inerente răspunsului de tip primar sau secundar li se adaugă cele determinate de unii factori proprii organismului-gazdă. Între aceştia, un rol deosebit revine: concentraţiei complementului, prezenţei unor celule care sintetizează şi eliberează mediatori (ca, de exemplu, mastocitele), afinităţii receptorilor de antigen etc. Efectele pot avea ca urmări atît un răspuns protector (imobilizarea bacteriilor, neutralizarea virusurilor infectante etc.), cît şi unele fenomene dăunătoare organismului-gazdă (şoc anafilactic, anafilaxie cutanată pasivă, reacţii de tip Arthus, hemoliză intravasculară etc.).

Bazele moleculare ale interacţiunii antigen — anticorp

Asocierea unei molecule de anticorp cu antigenul său specific depinde de interacţiunea necovalentă dintre situsul de combinare (situsul activ sau de legare) al anticorpului, care funcţionează ca un adevărat centru de recunoaştere, şi determinantul antigenic corespunzător. Lărgimea şi adîncimea situsului activ variază foarte mult. Forma sa exactă şi, implicit, specificitatea sînt determinate de numai cîţiva aminoacizi din regiunea hipervariabilă a catenelor L şi H, denumiţi determinanţi de complementaritate. Mărimea energiei de legare (cunoscută sub denumirea de „afinitate") a anticorpului pentru antigenul omolog este determinată de gradul de „potrivire" dintre determinantul antigenic şi situsul activ al anticorpului.

Forţele intermoleculare de atracţie implicate în reacţiile antigen—anticorp

Natura legăturii dintre antigen şi anticorp, şi specificitatea ei pot fi înţelese numai în funcţie de modul lor de legare şi de natura forţelor care le menţin. Formarea complexului antigen — anticorp are loc în două etape :

1) Etapa iniţială, foarte specifică, bazată pe complementaritatea structurală dintre determinantul antigenic şi situsul activ al anticorpului, respectiv pe adaptarea tridimensională a structurilor respective. Această complementaritate a fost gîndită, cel mai adesea, exclusiv structural, pe principiul „lacăt şi cheie" („lock and key"), în care „cheia" (determinantul antigenic) se potriveşte exact în lacăt (situsul activ al anticorpului). Concepţia actuală este bazată pe faptul că „potrivirea" structurală strînsă depinde de complementaritatea sterică a grupărilor chimice care definesc cele două molecule şi, de asemenea, de o complementaritate electrochimică (Absolom şi van Oss, 1986).

Cercetările de radiocristalografie au demonstrat că suportul molecular al acestei etape este reprezentat de interacţiunea dintre determinantul antigenic cu anumiţi aminoacizi din regiunea hipervariabilă a Ig. Ceilalţi aminoacizi, aparţinînd domeniilor variabile, deşi nu sînt implicaţi direct în legarea antigenului, au un rol important, funcţionînd ca un schelet sau cadru („framework") pentru plierea catenelor regiunilor V şi păstrarea integrităţii situsului de combinare.

2) Diferitele forţe intermoleculare intră în acţiune după ce s-a realizat adaptarea strînsă dintre antigen şi anticorp, stabilizînd şi consolidînd legătura dintre acestea. Forţele intermoleculare au caracter specific şi pot apărea între molecule diferite. Formarea lor necesită prezenţa unor grupuri de atomi suficient de apropiate pe cele două molecule, care să le permită să interacţioneze. Deşi o complementaritate strictă nu este absolut necesară, complementaritatea mai mare (prezenţa unor zone de contact mai întinse) furnizează, în general, formarea de forţe de atracţie intermoleculară şi de legături mai stabile, evitînd apariţia forţelor de repulsie.

Natura forţelor de legare dintre antigene şi anticorpi. Marrack (1938) a demonstrat că forţele de atracţie puternice, care menţin atomii în legături chimice specifice, sînt inoperante în reacţiile antigen—anticorp. În această categorie intră legăturile covalente de tipul celor dintre atomii liberi de H şi O, care sînt foarte puternice, ($\Delta G = -50 - -110$ kcal/mol). Forţele de atracţie care participă în reacţiile antigen — anticorp sînt slabe (4—14 kcal/mol^{-1}) şi sînt reprezentate de : 1) legături de hidrogen ; 2) forţe electrostatice ; 3) legături van der Waals, şi 4) forţe hidrofobe (fig. 38).

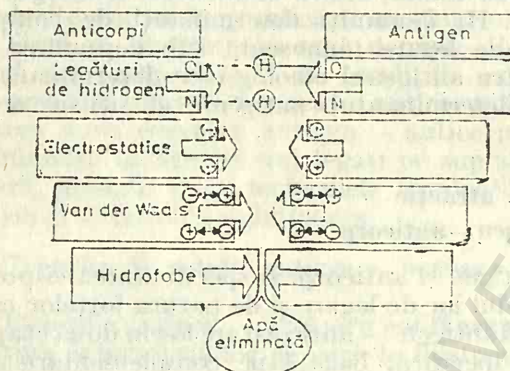


Fig. 38. — Reprezentare schematică a forţelor de atracţie intermoleculare implicate în legarea antigenului de anticorp (după Roitt, Brostoff şi Male, 1985).

Ca regulă generală, legătura dintre doi atomi este cu atît mai puternică cu cît aceştia sînt mai apropiaţi unul de altul. Astfel, doi atomi de H legaţi covalent se găsesc la o distanţă (d) de 0,74 Å, iar cînd sînt legaţi cu forţe van der Waals, la d = 1,2 Å. Datorită caracterului lor, forţele slabe de legare sînt eficiente numai dacă sînt multiple. Energia lor globală de legare este dată de numărul lor, iar acesta este dependent de complementaritatea sterică dintre antigen şi anticorp. Aceasta implică o anumită aliniere a atomilor sau a grupărilor reactive ale situsului de combinare al anticorpului, în raport cu atomii sau grupările complementare ale antigenului, în aşa fel încît unei grupări chimice reactive proeminente sau unei sarcini pozitive pe suprafaţa unei molecule să-i corespundă o concavitate sau o sarcină negativă pe cealaltă. Această condiţie explică de ce orice diminuare a gradului de complementaritate determină o creştere a forţelor de repulsie şi o diminuare a celor de atracţie, deci o scădere a energiei globale de legare.

Forţele de legare dintre antigene şi anticorpi sînt nespecifice şi nu diferă de cele care dirijează interacţiunea dintre proteine sau dintre proteine şi substratul lor. Natura lor permite ca unirea antigenului cu anticorpul să fie reversibilă. De aceea, specificitatea reacţiei antigen—anticorp este condiţionată exclusiv de complementaritatea lor.

Forţele electrostatice (ionice sau coulombiene) sînt rezultatul atracţiei dintre unul sau mai multe situsuri ionizate, de pe determinantul antigenic, şi cele cu sarcină opusă, din regiunea activă a situsului de legare a anticorpului. În interacţiunile antigen — anticorp, un rol esenţial revine

grupărilor ionizate carboxil și amino, aparținînd aminoacizilor polari ai moleculelor respective (spre exemplu, între gruparea COO^- a aspartatului de pe antigen cu gruparea NH_3^+ a lizinei din structura anticorpului). Juxtapoziția exactă a ionilor favorizează legarea electrostatică, deoarece energia de interacțiune a acestor legături variază invers în raport cu pătratul distanței $\left(\frac{1}{d^2}\right)$ și, ca urmare, este cu atît mai mare cu cît distanța de separare dintre antigen și anticorp este mai mică. Atracția coulombiană este semnificativă numai la distanțe de separare foarte mici ($<$ 100 Å), spre deosebire, spre exemplu, de legăturile van der Waals, care sînt active chiar la distanța de 1 000 Å.

Legăturile de hidrogen reprezintă un caz particular de legătură între dipoli și între ioni și dipoli. Ele iau naștere între un atom de H legat covalent, care posedă o sarcină reziduală pozitivă, și un atom acceptor, legat, de asemenea, covalent, care are o sarcină negativă. Astfel, H dintr-o grupare (spre exemplu ,OH) formează o legătură cu un atom electronegativ, ca O sau N. În mod obișnuit, interacțiunile dipol sînt întîlnite între grupările O—H și C=O, N—H și C=O, N—H și O—H, aparținînd, in special, aminoacizilor Arg, His, Lys, Asp, Glu, Asn, Ser, Thr, Tyr. Legăturile de H apar numai la distanțe foarte mici ($\sim$ 2—3Å), formarea lor necesitînd ca aminoacizii donatori și acceptori de H să fie opuși unii celorlalți, într-o aliniere perfectă. Energia de asociere realizată de legăturile de H este mică (3—7 Kcal/mol). Ele sînt importante, totuși, în interacțiunea antigen — anticorp, datorită numărului mare.

Legăturile van der Waals sînt cele mai slabe forțe de legare (1—2 Kcal/mol) și sînt efective numai pe o rază scurtă de acțiune. Ele nu se bazează pe existența unor separări permanente de sarcini, ci pe fluctuații ale acestora, induse de apropierea dintre molecule, respectiv de mișcările electronilor în unele molecule, care antrenează formarea de cîmpuri electrice instantanee ce polarizează moleculele învecinate. Ca urmare, între toți atomii care ajung suficient de apropiați unii de alții are loc o atracție mutuală, produsă între dipolul fluctuant ce apare într-un atom și un al doilea dipol, pe care primul dipol îl induce în al doilea atom.

Forțele interatomice și intermoleculare care apar în acest fel sînt denumite legături van der Waals-London sau forța de dispersie. Intensitatea lor depinde de distanța dintre grupările implicate, întrucît energia de legare este invers proporțională cu puterea a șaptea $\left(\frac{1}{d^7}\right)$ a distanței interatomice. Ca urmare, atracția produsă de legăturile van der Waals este cu atît mai mare cu cît „potrivirea" spațială dintre antigen și anticorp este mai bună.

Rolul lor în reacțiile antigen — anticorp este apreciat contradictoriu de diferiți autori. El ar corespunde unei atracții semnificative minime, cînd determinantul antigenic și situsul activ al anticorpului se găsesc la o distanță de $\sim$ 1 000 Å, și devine progresiv mai mare, pe măsură ce distanța se reduce, ajungînd la o valoare optimă cînd distanța este de 1—2 Å. Ca urmare, la temperaturi fiziologice, legăturile van der Waals

asigură o legare eficientă numai în cazul complementarităţii marcate, care asigură un contact strîns între grupările ce interacţionează.

Există şi o forţă de respingere van der Waals, care este mai puternică dacă distanţele sînt foarte reduse. Ea se realizează prin suprapunerea straturilor superficiale de electroni ale atomilor implicaţi în interacţiune (fig. 39).

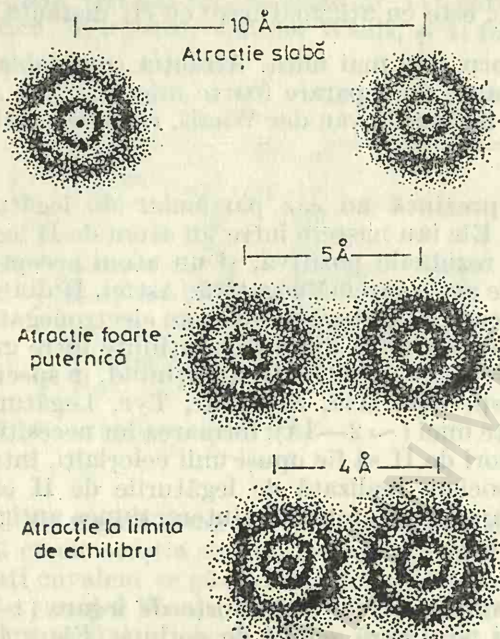


Fig. 39. — Reprezentare schematică a forţelor de atracţie şi de respingere van der Waals, în raport cu distribuirea electronilor în moleculele monoatomice ale argonului (după Pauling, 1958).

Legăturile hidrofobe (sau apolare) apar între grupări apolare în soluţii apoase şi acţionează ca urmare a tendinţei de excludere a reţelei ordonate de molecule de apă dintre moleculele dizolvate. Un exemplu caracteristic este cel al grupărilor apolare din structura catenelor laterale ale unor aminoacizi (Val, Leu, Izoleu, Pro, Phe, Tyr, Trp, Met ş.a.), care au tendinţa de self-asociere, diminund numărul moleculelor de apă din vecinătatea lor, atunci cînd ajung în contact foarte apropiat. În mod similar, în interacţiunea antigen — anticorp, apa de hidratare poate fi eliminată din regiunea de legare, diminuînd astfel distanţa dintre suprafeţele care interacţionează şi mărind forţele de atracţie stabilizante.

După van Oss, Absolom şi Neumann (1980), interacţiunile hidrofobe rezultă în cele din urmă din forţe van der Waals (fig. 40).

Afinitatea

Afinitatea măsoară forţa de legare dintre un determinant antigenic (epitop) şi situsul complementar de legare al unui anticorp specific (paratop), respectiv suma forţelor de atracţie şi de repulsie dintre cele două molecule ale complexului antigen — anticorp. Forţa acestor interacţiuni este determinată de proprietăţile fizicochimice ale moleculelor respective şi poate fi calculată utilizînd un antigen monovalent sau o haptenă cu un determinant antigenic unic (de exemplu, 2,4-dinitrofenol).

Dializa la echilibru. Au fost imaginate mai multe tehnici de apreciere a afinității situsului activ al anticorpilor, cea mai simplă fiind dializa la echilibru ("Equilibrium dialysis"). Ea se bazează pe proprietatea haptenelor mici, monovalente (neprecipitante), de a traversa membranele de dializă care rețin anticorpii și complexele haptenă — anticorp.

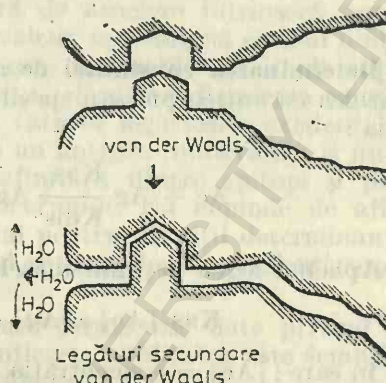


Fig. 40. — Reprezentare schematică a interacțiunilor van der Waals primare și secundare între epitopi și paratopi. În cursul formării complexului antigen—anticorp, apa de hidratare este eliminată, diminuînd distanța dintre suprafețele ce interacționează, cu formarea de legături secundare datorite apropierii mari induse. Moleculele de apă extrudată contribuie la o entropie crescută a sistemului și deci a stabilității legăturii antigen—anticorp, deoarece ele devin capabile să adopte o orientare, mai aleatorie (după Absolom și van Oss, 1986).

În acest scop, soluția concentrată de anticorpi este pusă într-un sac de dializă, care este imersionat într-un volum cunoscut de soluție tampon pH 7,4, ce conține o concentrație cunoscută a haptenei (10^5—10^6 M). Haptena liberă difuzează, prin membrană, în compartimentul care conține anticorpul și se combină parțial cu acesta. La echilibru se măsoară concentrația haptenei libere de la exterior (care este egală cu cea a haptenei libere din interiorul sacului) și concentrația haptenei legată de anticorp (fig. 41). Concentrația globală a haptenei în sacul de dializă este mai

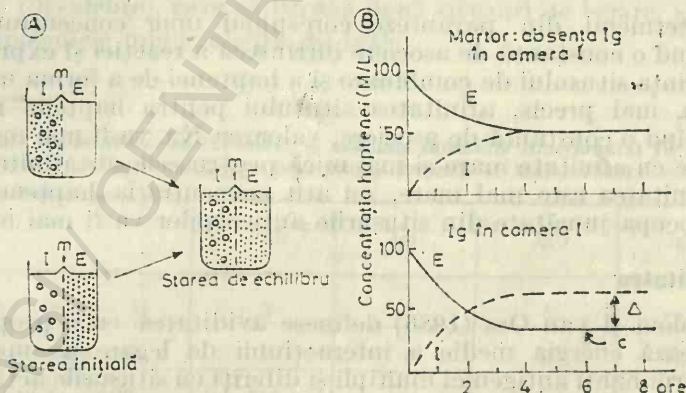
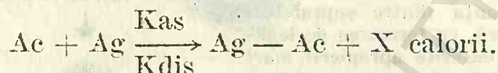


Fig. 41. — Dializa la echilibru. A. Haptenele monovalente cu g.m. mică (puncte mici) difuzează liber de o parte și de alta a compartimentelor I și E, în timp ce moleculele de anticorpi (●) rămîn în compartimentul 1. La echilibru, concentrația haptenelor este superioară în compartimentul I, deoarece o parte din ele sînt legate de anticorpii prezenți în acest compartiment. B. Modificările în concentrația haptenei în timp. Echilibrul este atins în ~ 4 ore. În experiența prezentată, haptena a fost pusă inițial în compartimentul E. C. Concentrația haptenei libere la echilibru. Δ = Concentrația haptenei legate (după Eisen, 1976).

mare, deoarece o parte din ea este legată de anticorp. Cantitatea de haptenă legată de anticorp poate fi stabilită determinînd diferența dintre cantitatea de haptenă globală adăugată sistemului la începutul experienței și cantitatea de haptenă liberă aflată de cele două părți ale membranei. La echilibru, concentrația haptenei legate și libere din interiorul sacului și a celei libere din afara lui depind de concentrația și afinitatea anticorpilor.

Determinarea constantei de afinitate. Interacțiunea unei molecule de antigen cu anticorpul său specific la echilibru poate fi exprimată prin ecuația :



$$Ac + Ag \underset{Kdis}{\overset{Kas}{\longrightarrow}} Ag - Ac + X \text{ calorii.}$$

Aplicînd legea acțiunii maselor acestei interacțiuni se obține

$$Kas\ [Ac] \cdot [Ag] = Kdis\ [Ag - Ac]$$

în care : [Ac] = concentrația situsurilor de legare liberă ale anticorpilor ;

[Ag] = concentrația determinanților antigenici liberi ; [Ag — Ac] = concentrația complexului imun ;

Kas = constanta ratei de asociere ;

Kdis = constanta ratei de disociere.

Ecuația permite calcularea constantei de afinitate sau de echilibru (Ka) după formula :

$$Ka = \frac{Kas}{Kdis} = \frac{[Ag - Ac]}{[Ag] \cdot [Ac]}$$

în care termenii din paranteze corespund unor concentrații molare reprezentînd o constantă de asociere intrinsecă a reacției și exprimă cantitativ tendința situsului de combinare și a haptenei de a forma un complex stabil sau, mai precis, afinitatea situsului pentru haptena respectivă. Reprezentînd o constantă de asociere, valoarea Ka va fi mai mare pentru complexele cu afinitate mare și mai mică pentru cele cu afinitate redusă. Cu cît afinitatea este mai mare, cu atît concentrația haptenei necesară pentru a ocupa jumătate din situsurile anticorpilor va fi mai mică.

Aviditatea

Absolom și van Oss (1986) definesc aviditatea ca o proprietate ce caracterizează energia medie a interacțiunii de legare a unui antigen avînd determinanți antigenici multipli și diferiți cu situsurile active heterogene ale anticorpilor induși de ei. Numeroase observații au arătat că anticorpii dintr-un antiser imun, cu excepția celor monoclonali care sînt perfect omogeni (indicele de heterogenitate = 1), au o mare heterogenitate de afinitate. Această particularitate nu este surprinzătoare, deoarece chiar în cazul unor substanțe simple, cum sînt unele haptene, anticorpii pot fi dirijați față de diferite regiuni ale moleculei. În cazul macromolecu-

lelor naturale, numărul determinanților antigenici este aproape totdeauna necunoscut. În cazul proteinelor, acești determinanți sînt diferiți, în timp ce în cazul polizaharidelor, determinanții antigenici sînt identici și repetați în mai multe exemplare. În ambele cazuri, antigenele sînt complexe și „multiantigenice" (multivalente). De aceea, în aceste cazuri este practic imposibil de determinat o constantă de asociere intrinsecă pentru un anticorp dat. Cînd un antigen multivalent se combină cu mai multe situsuri ale anticorpilor, energia de legare rezultată este mult superioară celei a fiecărui situs de legare implicat, deoarece disocierea complexului antigen — anticorp necesită ruperea tuturor legăturilor existente. Aviditatea măsoară forța de legare dintre un antigen multivalent și anticorpii induși de el, respectiv rezultanta afinității dintre epitopi și paratopi, dintre valențele antigenului și anticorpului. Ea depinde de afinitatea fiecărui situs de legare al anticorpului pentru diferiții determinanți antigenici și este, în cazul antigenelor și al anticorpilor multivalenți, superioară sumei acestor afinități.

Spre deosebire de afinitate, care furnizează date privind natura fiziochimică a reacțiilor antigen — anticorp, aviditatea este semnificativă pentru atigenele naturale sau multivalente.

Tabelul nr. 20 evidențiază criteriile de diferențiere a afinității intrinseci de aviditate (afinitatea funcțională). El arată că un antigen monovalent se leagă cu aceeași afinitate de un anticorp monovalent (un fragment Fab) sau multivalent. Calculul constantelor de echilibru demonstrează însă, că o legătură multivalentă între antigen și anticorp (aviditatea) este mult mai stabilă decît o legătură monovalentă (afinitatea intrinsecă) aleasă arbitrar ca 10^4, în acest exemplu. Acest avantaj al multivalenței („Bonus effect") permite să crească energia de legare de 10^3 ori în cazul IgG (bivalente), care utilizează două situsuri de legare, și de 10^7 ori pentru moleculele multivalente de IgM.

Tabelul nr. 20

Relațiile dintre afinitatea intrinsecă și aviditate (afinitate funcțională) în reacțiil antigen—anticorp (după Roitt, Brostoff și Male, 1986)

	Fab	IgG	IgG	IgM
Valența eficace a Ig	1	1	2	→10
Valența antigenului	1	1	n	n
Constanta la echilibru	10^4	10^4	10^7	10^{11}
Avantajul multivalenței	—	—	$\times 10^3$	$\times 10^7$
Definiția legăturii	Afinitate	Afinitate	Aviditate	Aviditate
	Afinitate intrinsecă		Aviditate (Afinitate funcțională)	

Importanţa afinităţii şi avidităţii. Afinitatea şi aviditatea anticorpilor condiţionează proprietăţile lor fiziologice şi imunopatologice. Anticorpii cu afinitate mare sînt mai eficienţi în numeroase reacţii biologice (eliminarea imunitară a antigenelor, protecţia antibacteriană, neutralizarea virusurilor, hemoliză, aglutinare, precipitare, hemaglutinare, lezarea membranelor etc.).

În imunopatologie situaţia este inversată. Complexele antigen —anticorp determinate de anticorpi cu afinitate mică persistă în circulaţie, se depun, spre exemplu, pe membrana bazală a glomerulului renal, şi determină insuficienţă renală. În schimb, cele ce conţin anticorpi cu afinitate mare sînt eliminate mai rapid şi trec din circulaţie în zona mezangială a rinichiului, fără a altera funcţia renală (Roitt, Brostoff şi Male, 1986).

Factorii care influenţează asocierea antigen — anticorp

Interacţiunile fizice iniţiale dintre un antigen cu anticorpul său specific sînt, în esenţă, rezultatul unui proces aleatoriu, care face ca un determinant antigenic să vină în contact cu situsul activ al anticorpului omolog. Şansele ca reacţia dintre cele două structuri complementare să aibă loc pot fi mărite de o serie întreagă de condiţii a căror pondere este diferită, în funcţie de :

1) Concentraţia anticorpilor specifici (cu cît este mai mare, cu atît şansele de „întîlnire" eficientă sînt mai mari).

2) Concentraţia antigenului (numărul, accesibilitatea, aranjamentul şi heterogenitatea determinanţilor antigenici omologi).

3) Clasa, subclasa şi specia de origine a Ig.

4) Temperatura. Reacţia antigen — anticorp are ca rezultat o reducere a energiei libere nete a sistemului. Această energie se poate manifesta fie ca o reacţie exotermică, fie ca o creştere netă a entropiei sistemului. Reacţiile exotermice au loc mai intens la temperaturi joase, iar cele endotermice la temperaturi ridicate. Cu cele mai multe seruri imune studiate, frecvenţa formării complexelor antigen — anticorp este mai mare la + 4°C decît la 37°C (Mukkur, 1980), dar la temperaturi mai ridicate creşte viteza de asociere. În practică, pentru o serie de reacţii (aglutinare, RFG, precipitare etc.), amestecul este incubat, cu rezultate bune, la 37°C.

5) Valorile limitelor de pH. În general, s-a observat că reacţiile antigen — anticorp sînt relativ insensibile la variaţiile de pH, în limitele de pH 6,5—8,5.

6) Forţa ionică : prezenţa electroliţilor poate contribui la stabilizarea reacţiei dintre antigen şi anticorp, deoarece afectează interacţiunile electrostatice. Numeroase studii au evidenţiat că atît concentraţia, cît şi natura electroliţilor pot varia în funcţie de sistemul studiat.

În interpretarea acestor date, Absolom și van Oss (1986) menționează ca esențial faptul că orice legătură stabilă antigen — anticorp este rezultatul net al unei acțiuni continui și combinate de formare de legături și de rupere de legături, datorită naturii diferitelor forțe. Nici complementaritatea structurală singură și nici forțele individuale intermoleculare nu sînt suficiente pentru a produce o legătură stabilă. Cu cît complementaritatea dintre gruparea determinată a antigenului și situsul activ al anticorpului este mai mare și apropierea lor mai strînsă, cu atît mai mare va fi numărul legăturilor ce pot fi formate. Aceasta va determina o creștere a legăturii dintre antigen și anticorp, și o valoare mai mare a constantei de echilibru Ka, ceea ce înseamnă o energie mai mare de legare (afinitate) pentru interacțiunea respectivă.

Specificitatea și reactivitatea încrucișată

Specificitatea reprezintă capacitatea unui anticorp de a deosebi antigenul față de care a fost produs (antigenul sau imunogenul omolog) de alte antigene diferite, care au însă o structură asemănătoare, prin combinarea cu ele cu o afinitate diferită. În general, cu cît diferența de afinitate pentru două structuri strîns înrudite este mai mare, cu atît anticorpul este mai specific pentru antigenul față de care afinitatea este mai puternică. Deoarece majoritatea antigenelor naturale posedă determinanți antigenici multipli, antiserurile imune prezintă, în general, un grad important de heterogenitate. Chiar cele purificate conțin adesea un amestec de anticorpi cu afinități variabile. Ca urmare, specificitatea unei populații de anticorpi, corespunzînd antiserurilor, convenționale, nu decurge din specificitatea unică a anticorpilor, ci din existența unui număr mare de anticorpi polispecifici, care au toți situsuri capabile să se combine cu un determinant antigenic al ligandului respectiv. Global însă, capacitatea de a reacționa este mai mare pentru antigenul omolog și mai slabă pentru alte antigene doar asemănătoare. Aceasta face ca antiserurile să fie, în general, specifice, fapt care permite utilizarea lor în serologie pentru identificarea diferiților agenți patogeni (virusuri, bacterii etc.).

Karush (1978) a propus utilizarea termenului de selectivitate pentru a caracteriza capacitatea unui anticorp de a discrimina pe principiul „totul sau nimic" doi liganzi înrudiți. Selectivitatea nu depinde numai de afinitatea relativă a anticorpului pentru cei doi liganzi, ci și de limita experimentală cea mai joasă de detectare a reactivității. Astfel, un anticorp cu o afinitate de $10^5 M^{-1}$ pentru un imunogen glucidic poate fi foarte selectiv, deoarece reacția lui cu un glucid înrudit, cu o afinitate de 3 ori mai mică ($10^3 M^{-1}$), este nedetectabilă.

Reactivitatea încrucișată reprezintă capacitatea anticorpilor de a reacționa cu liganzi înrudiți, dar diferiți de antigenul omolog (fig. 42).

Berzofsky și Schechter (1981) au definit două tipuri de reactivitate încrucișată („Cross-reactivity") și, respectiv, două tipuri de specificitate:

Tipul I, sau reactivitatea încrucișată adevărată, corespunde capacității a doi liganzi de a reacționa cu același situs, de pe aceeași mole-

culă de Ig-anticorp, dar cu afinități diferite. Reacția este tipică în cazul haptenelor înrudite, DNP (dinitrofenol) și TNP (trinitrofenol), care pot racționa cu afinități diferite pentru anticorpii produși de DNP. În cazul antigenelor proteice, acest tip de reactivitate poate fi determinat de mici modificări în secvența primară a polipeptidului (de exemplu, prezența treoninei în locul serinei sau a glicocolului în locul alaninei) sau de modificări conformaționale. Spre exemplu, anticorpul poate reacționa ca un fragment peptidic derivat prin clivarea enzimatică a antigenului, dacă acesta conține toate resturile de aminoacizi care intră în contact cu situsul de combinare al anticorpului produs de antigenul întreg. Reacția are loc cu o afinitate mai mică, deoarece fragmentul nu păstrează configurația nativă.

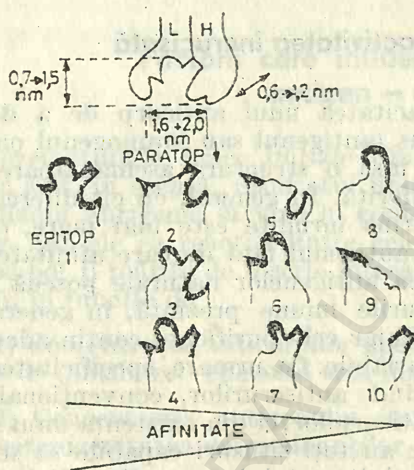


Fig. 42. — Reprezentare schematică bidimensională a interacțiunilor dintre paratopul unui anticorp și epitopii cu care poate interacționa. Regiunile înnegrite pe epitopi marchează suprafețele prin care aceștia se pot lega cu paratopii (după McCullough, 1986).

Reacțiile de tip II („Shared reactivity") apar numai în cazul antiserurilor convenționale, care conțin o populație heterogenă de anticorpi. Ele sînt dependente de capacitatea ligandului care reacționează încrucișat de a se combina cu o subpopulație din serul heterogen. Dacă, spre exemplu, antigenul este o proteină care poartă determinanții antigenici X, Y și Z, antiserul imun produs de el va conține anticorpi anti-X, anti-Y și anti-Z. Un al doilea antigen, care are determinantul X alterat prin mutație în așa fel încît nu mai poate fi recunoscut de anticorpul anti-X (determinanții Y și Z fiind normali), va prezenta reacții încrucișate de tipul II. El va competiționa cu proteina de tip „sălbatic" (normală) pentru anticorpii anti-Y și/sau anti-Z (dar nu și pentru anticorpii anti-X), posibil chiar cu afinitate egală.

Cele două tipuri de reactivitate încrucișată pot apărea și simultan. Studiile la nivel molecular au demonstrat că reacțiile încrucișate nu implică identitatea grupărilor funcționale ale liganzilor heterologi, ci numai similaritate. Astfel, s-a demonstrat că anticorpii anti-2, 3-dinitro-

fenil-lizil reacționează încrucișat cu 2,4,6-trinitrobenzenul, iar m-azobenzen-sulfonatul dă reacții încrucișate cu m-azobenzen-arsenatul.

Caracterele generale ale reacțiilor încrucișate:

1) Antiserurile imune dau reacții mai intense cu antigenul omolog decît cu cele care dau reacții încrucișate, deoarece antigenele eterologe reacționează, de regulă, numai cu o anumită proporție din anticorpii total produși de imunogen.

2) Anticorpii purificați, cu o specificitate dată, vor avea, de asemenea, o afinitate mai mare pentru ligandul omolog decît pentru cei cu care dau reacții încrucișate.

3) Reacțiile încrucișate mutuale dintre două antigene nu sînt, de regulă, cantitativ echivalente. Anticorpii față de antigenul A pot reacționa mai intens cu antigenul B decît reacționează anticorpii anti-B cu antigenul A.

4) Liganzii care produc reacții încrucișate tind să se lege mai puternic de anticorpii cu afinitate mare decît de cei cu afinitate mică pentru ligandul omolog. De aceea, anticorpii cu afinitate mică produc mai puține reacții încrucișate decît cei cu afinitate mare. Afinitatea mică a sistemelor polizaharid — antipolizaharid explică marea specificitate a antiserurilor utilizate în tipizarea serologică a bacteriilor și a celulelor, pe baza glucidelor de pe suprafața lor.

Antiserurile care reacționează încrucișat pot fi făcute monospecifice și utilizate ca reactiv analitic, după tratarea lor cu antigenele cu care reacționează încrucișat și îndepărtarea anticorpilor corespunzători, odată cu complexele mari (precipitate sau anticorpi legați de celule). Îndepărtarea anticorpilor implicați în reacțiile încrucișate se mai poate realiza prin trecerea serului pe o coloană de agaroză de care, în prealabil, a fost legat covalent antigenul cu care dau aceste reacții.

Reacțiile încrucișate sînt folosite în practică pentru identificarea grupurilor mari serologice de bacterii *Salmonella*, care cuprind tulpini ce reacționează încrucișat unele cu altele.

Disocierea reacțiilor antigen—anticorp

Este probabil că toate reacțiile antigen — anticorp sînt reversibile. Așa-zisele reacții ireversibile corespund fie cazurilor în care nu sînt prezente condițiile optime de disociere, fie observațiilor care n-au fost urmărite suficient timp (în unele cazuri, T 1/2 al disocierilor poate dura cîteva zile). Disocierea complexului antigen — anticorp poate fi considerată ca o reacție unimoleculară în care viteza de reacție este dependentă, în principal, de concentrația complexului. Există puține date noi asupra vitezei absolute de disociere a complexelor antigen — anticorp.

Talmage (1960) a apreciat viteza constantă de disociere a complexului albumină marcată cu ^{131}I de anticorpii respectivi provenind de la iepure la $5 \times 10^{-5}\ s^{-1}$, ceea ce corespunde la un T 1/2 ceva mai mare de trei ore. În alte sisteme aceste valori variază între două și opt zile (Hughjones, 1963).

Sensibilitatea testelor de determinare a anticorpilor

Diferitele reacţii serologice utilizate pentru identificarea antigenelor sau a anticorpilor diferă nu numai prin natura ingredientelor şi a condiţiilor fizice şi chimice în care sînt efectuate, ci şi prin sensibilitatea lor în detectarea unor cantităţi minime de substanţe specifice. Astfel, spre exemplu, aglutinarea este mult mai sensibilă decît precipitarea, deoarece, după Eisen (1960), particulele sau celulele relativ mari permit amplificarea efectului vizibil. Ca urmare, antiserurile, faţă de bacterii sau hematii, pot fi diluate de mii de ori. Diferenţa de sensibilitate este clar ilustrată de limitele aglutinante şi precipitante ale antiserului faţă de ovalbumina de găină care aglutinează particulele de colodiu acoperite cu antigen

Tabelul nr. 21

Sensibilitatea comparată a diferitelor reacţii, exprimată în concentraţii minime de anticorpi detectabili (valori medii, după date din literatură)

Reacţia	Limita de detectare *	Reacţia	Limita de detectare *
Precipitare în mediu lichid	20–30	Neutralizarea toxinei difterice	0,01
Imunodifuzie simplă (Oudin)	12–110	Analiza radioimună	<0,001
Imunodifuzie dublă (Ouchterlony)	>40	Imunoelectroforeză	5–10 mg
Imunodifuzie radială (Mancini)	10	Imunofluorescenţă cantitativă	5–10 mg
Aglutinare *Salmonella*	0,12	Anafilaxie cutanată pasivă	0,01–0,03
Aglutinare *Streptococcus pneumoniae*	60–120	Neutralizarea fagului **	O moleculă Ig
Hemaglutinare directă	0,5–1	Neutralizarea Poliovirus **	O moleculă Ig
Hemaglutinare indirectă (pasivă)	0,001–0,03	Imunocitoaderenţă **	O celulă acoperită cu anticorpi
Hemoliză imună	0,001–0,03	Tehnica anticorpilor citotoxici **	O celulă acoperită cu anticorpi
Fixarea complementului	0,01–0,1	Testul Jerne (hemoliza în plăci) **	O celulă producătoare de anticorpi

* Valori exprimate în μg N din anticorpi per ml, unde nu este menţionat altfel.
** Limită teoretică de detectare. Sensibilitatea metodelor, în general, poate fi mult redusă de diferite probleme tehnice.

chiar diluat 1 : 10 000, dar nu precipită diluat 1 : 5. Diferențele mari de sensibilitate ar putea fi determinate de numărul de particule necesare pentru o reacție vizibilă : $\sim 10^7$ celule bacteriene (ceea ce ar putea corespunde la 10^9 molecule de antigen de suprafață) și, respectiv, 6×10^{12} molecule de antigen solubil ($= \sim 1$ μg de proteină cu g. m. 100 000 dal).

Cunoașterea sensibilității diferitelor reacții este importantă în alegerea unei tehnici adecvate scopului urmărit (tabelul nr. 21).

Ipoteza caracterului unitar al anticorpilor. Numeroși cercetători au semnalat prezența mai multor tipuri de activități în serurile imune. Astfel, serul antiholeric poate proteja cobaii față de inocularea unei doze letale de *Vibrio cholerae*, aglutinează aceste bacterii, le lizează în prezența complementului, intensifică fagocitarea lor, precipită filtratul culturii în bulion etc. Aceste observații au dus la ipoteza pluralistă, după care fiecare din aceste activități ar fi dată de un anumit tip de anticorp, calitativ diferit, care funcționează, după caz, ca bacteriolizine, aglutinine, opsonine, precipitine etc.

Ipoteza a fost infirmată de o serie de observații, avînd ca punct de plecare experiențele lui Heidelberger (1939), care a demonstrat că precipitarea anticorpilor față de un polizaharid capsular de pneumococ suprimă toate activitățile serului respectiv și că toate aceste activități sînt recăpătate după disocierea precipitatului.

A fost formulată o ipoteză unitară („Unitarian hypothesis"), în conformitate cu care fiecare moleculă de anticorp este capabilă să exercite toate activitățile descrise, corespunzător specificității lor. Ca urmare, o anumită populație de anticorpi poate prezenta, în urma reacțiilor de combinare cu antigenele, toate consecințele posibile, în funcție de starea ligandului (antigenului) și/sau de natura mediului în care are loc combinarea lor. Astfel, dacă ligandul este solubil și multivalent are loc o precipitare. În cazul că reprezintă o grupare chimică legată de suprafața unei particule sau celule, reacția aparentă este de aglutinare. În cazul determinanților antigenici legați de bacterii, efectul este de opsonizare și protecție.

Eisen (1976) consideră că ideea totipotenței anticorpilor reprezintă o suprasimplificare, deoarece nu are valoare absolută. Există anticorpi care produc unele reacții (precipitare), dar nu și altele (neutralizare, fixare de complement etc.). Cei mai mulți anticorpi produc mai multe activități, sînt deci în mare măsură multipotenți, dar nu totipotenți.

Precipitarea

Fenomenul de imunoprecipitare a fost descoperit de Kraus (1897), însă studiul său sistematic a fost inițiat abia în anul 1937 de către Heidelberger, care a utilizat ca antigene, în special, polizaharidul capsular de tip III de la *Streptococcus pneumoniae* și ovalbumina de găină. S-a demonstrat că, dacă se adaugă într-o serie de eprubete cantități crescînde de antigen, la o cantitate fixă de antiser corespunzător preparat pe iepure apare o opalescență care crește progresiv de-a lungul șirului de eprubete pînă la un anumit punct, dincolo de care scade. Heidelberger și Kendall (1937) au studiat acest fenomen pe două căi : 1) determinînd cantitatea de

N din precipitat, corespunzătoare antigenului * şi anticorpilor ; 2) examinînd supernatantele obţinute după îndepărtarea precipitatului prin tratarea cu antigen proaspăt (pentru a detecta prezenţa anticorpilor nelegaţi) şi, respectiv, cu anticorpi, pentru a determina prezenţa antigenului liber (tabelul nr. 22).

Tabelul nr. 22

Rezultatele reacţiilor de precipitare a polizaharidului capsular de la *Streptoccocus pneumoniae* **tip III**

Tubul nr.	Cantitatea de antigen (mg)	Cantitatea de anticorpi precipitaţi	Testarea supernatantului
1	0,02	1,82	Exces de anticorpi
2	0,06	4,79	Exces de anticorpi
3	0,08	5,41	Exces de anticorpi
4	0,10	5,79	Exces de anticorpi
5	0,15	6,13	Absenţa antigenului şi anticorpilor
6	0,20	6,23	Uşor exces de antigen
7	0,50	5,87	Exces de antigen
8	1,00	3,76	Exces de antigen
9	2,00	2,10	Exces de antigen

* Testările s-au făcut în prezenţa a 0,7 ml/tub ser imun de iepure (după datele lui Heidelberger şi Kendall, 1937).

Înregistrate grafic, rezultatele dau o curbă ce poate fi divizată în trei zone :

1) Zona 0—P, ascendentă, a curbei, corespunde unui exces de anticorpi, care pot fi detectaţi în supernatant după ce precipitatul a fost complet sedimentat.

2) Zona de echivalenţă P—B, în care nici antigenele şi nici anticorpii nu sînt prezenţi în supernatant în cantităţi apreciabile.

3) Zona descendentă a curbei, în care antigenul este prezent dincolo de B, în exces, şi poate fi evidenţiat în supernatant (fig. 43). În cazul sistemelor ,,ideale'' monospecifice, cel mai adesea, cantitatea maximă de precipitat este întîlnită cînd în suspernatant există un mic excedent de

* Polizaharidul pneumococului de tip III este lipsit de N, astfel incît concentraţia acestuia reflectă exclusiv cantitatea anticorpilor din supernatant.

antigen liber. Cele mai multe antigene sînt însă multiantigenice și/sau „contaminate" cu alte antigene neînrudite, astfel încît, în cazul utilizării lor împreună cu antiserurile corespunzătoare, precipitarea reprezintă, în realitate, suma mai multor reacții de precipitare monospecifice (fig. 44).

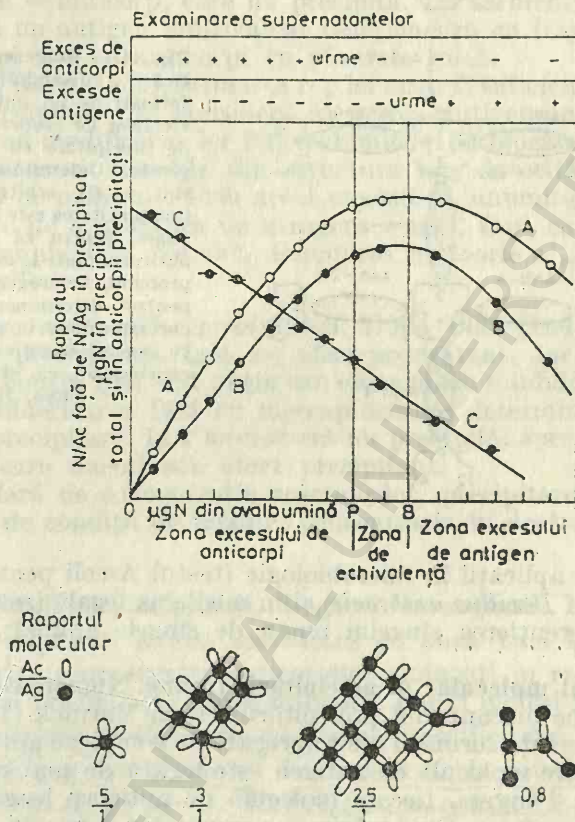


Fig. 43. — Evoluția cantitativă a reacției de precipitare între ovalbumină și serul imun de iepure anti-ovalbumină. Abscisa = cantitatea de antigen adăugat, exprimată în azot (N): A — greutatea totală a N precipitat; B — greutatea N din anticorpii din precipitat; C — raportul dintre N-anticorpi și N-antigen în precipitat. Jos: reprezentarea schematică a modului ipotetic de aranjare a moleculelor de antigen și de anticorp în complexele antigen — anticorp, în conformitate cu ipoteza „rețelei": $\frac{5}{1}$ = exces extrem de anticorpi, cu satisfacerea tuturor valențelor (5) antigenului; $\frac{3}{1}$ = exces moderat de anticorpi; $\frac{2,5}{1}$ = „proporții optime"; 0,8 = exces de antigen; 0,5 = exces extrem de antigen, cu toate valențele anticorpilor satisfăcute (după Roitt, 1976).

Una din formele cele mai simple ale reacțiilor de precipitare este testul „inelului" („Ring test"), practicat într-un tub cu diametru mic. Reacția pozitivă este caracterizată prin formarea unui disc alb de precipitat în zona interfacială dintre cele două lichide perfect clare, care cores-

pund antigenului şi anticorpilor. Reacţia are loc cu o gamă largă de concentraţie a reactanţilor, pe măsură ce antigenul şi anticorpul difuzează unul în celălalt.

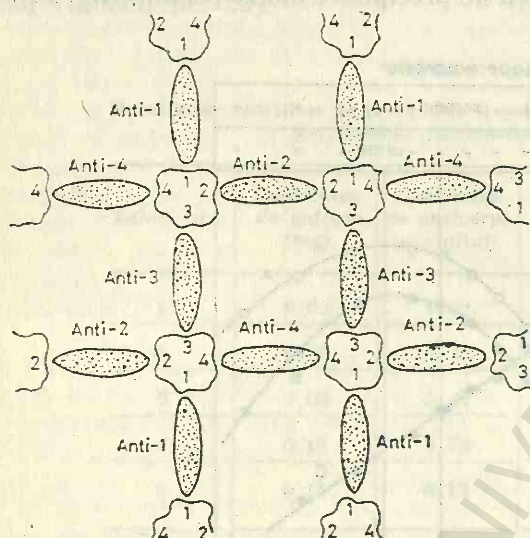


Fig. 44. — Reprezentare schematică a diversităţii anticorpilor formaţi de un antigen pur şi a efectelor lor cooperante în reacţia de precipitare cu antigenul respectiv. Determinanţii antigenici sînt notaţi arbitrar 1, 2, 3, 4. Complexitatea este în realitate mai mare, pentru că fiecare set de anticorpi (anti-1, anti-2 etc.) este, probabil, heterogen ca afinitate pentru determinantul antigenic corespunzător. În plus, anticorpii cu aceeaşi specificitate pot diferi considerabil ca structură (după Eisen, 1976).

Reacţia are aplicaţii în microbiologie (testul Ascoli pentru diagnosticul infecţiilor cu *Bacillus anthracis*) şi în medicina legală (reacţia Uhlenhuth pentru diferenţierea sîngelui uman de sîngele animal).

Mecanismul molecular al precipitării imune. Numeroase teorii au încercat să explice mecanismul precipitării. După Marrack (1938), precipitarea ar fi consecinţa formării unor agregate de complexe antigen—anticorp, în care fiecare moleculă de antigen este legată de mai multe molecule de anticorp şi invers, fiecare moleculă de anticorp leagă mai mult de o moleculă de antigen. Cînd mărimea agregatelor depăşeşte un anumit volum critic, ele devin spontan insolubile şi sedimentează cu o viteză proporţională cu volumul.

Precipitarea evoluează în două faze: 1) prima, rapidă, durează cîteva minute şi corespunde formării „reţelei" de complexe solubile; 2) cea de-a doua, lentă, care poate dura multe ore, corespunde perioadei de agregare a complexelor în precipitate vizibile, care uneori ating dimensiunile maxime după cîteva zile. Asocierea progresivă a moleculelor de anticorpi învecinate este urmată de stabilirea unor punţi ionice între grupuri cu sarcină diferită. Diminuarea solubilităţii complexelor se explică prin creşterea volumului agregatelor şi diminuarea densităţii sarcinilor de suprafaţă.

În baza acestor date, Pillot (1974) consideră că precipitarea unui antigen nu este posibilă decît dacă el posedă cel puţin trei determinanţi antigenici per moleculă. În felul acesta, el poate forma o reţea tridimensională în prezenţa anticorpilor, care trebuie să fie cel puţin bivalenţi.

Ca urmare, dacă un antigen are trei determinanți antigenici de tip A și un determinant B, anticorpul bivalent anti-A va fi precipitat, în timp ce anticorpul anti-B, nu. El va putea fi coprecipitant, în măsura în care va fi antrenat în precipitatul format prin unirea de A și B. Dacă antigenul este univalent (haptenă) sau numai bivalent, se formează complexe solubile antigen — anticorp, care nu precipită. De asemenea, precipitarea nu apare dacă un antigen multivalent reacționează cu fragmente univalente de anticorpi sau cu anticorpi cu afinitate mică.

După Boyd (1956), formarea rețelei nu ar fi suficientă pentru a explica apariția precipitării. El consideră că unirea antigenului cu anticorpul ar fi asociată cu modificarea lor fizico-chimică și cu blocarea sau „mascarea" anumitor situsuri hidrofile din structura lor, datorită vecinătății celor două tipuri de molecule. Prin acest mecanism, anumite grupări polare ar fi deturnate de la rolul lor de atragere a apei, fapt care duce la insolubilitatea complexului. De aici, denumirea de teorie a „blocării" („Occlusion theory").

Natura anticorpilor precipitanți. După Pike (1967), IgG sînt anticorpii tipic precipitanți. IgM au efect precipitant, dar mai lent. Precipitatele care conțin IgM sînt puțin sau chiar deloc solubile în exces de antigen. Depolimerizarea IgM cu mercaptoetanol determină pierderea capacității de precipitare. IgA monomeră nu precipită, spre deosebire de IgA polimeră, care uneori are efect precipitant.

În afară de concentrația reactanților, precipitarea este influențată de o serie de condiții de mediu : concentrația în electroliți, pH, temperatură etc.

Anticorpii neprecipitanți. Legarea monogamă. Existența anticorpilor neprecipitanți a fost semnalată pe baza unei lipse de proporționalitate între concentrația anticorpilor adăugați în reacție și cantitatea de anticorpi precipitați. Acești anticorpi pot fi incluși în complexele care conțin anticorpii precipitanți cu aceeași specificitate.

Inițial, s-a considerat că fenomenul ar fi determinat de prezența unor anticorpi monovalenți. În prezent, se consideră că are două cauze potențiale :

1) Prezența de anticorpi multivalenți cu afinitate slabă. Precipitarea lor necesită adăugarea unor concentrații mari de antigen, care determină formarea de complexe solubile, prin excedent de antigen.

2) Fenomenul de bivalență monogamă. Anumiți anticorpi bivalenți cu afinitate mare nu formează precipitate, deoarece se combină preferențial cu două grupări determinante învecinate de pe suprafața aceleiași molecule binare de antigen. Ei formează complexe ciclice Ac•Ag în loc de complexe legate încrucișat (Ag•Ac•Ag•Ac) (fig. 45).

Acest tip de legare, bivalența monogamă, este condiționat de existența unor antigene cu determinanți de tip repetitiv, ca polizaharidele capsulare ale bacteriilor sau ca unii determinanți de suprafață ai viru

surilor, hematiilor etc. După Eisen (1976), este probabil că anticorpii, în general, ar avea tendinţa de a realiza preferenţial legături bivalente monogame. Acest fenomen nu se produce frecvent, deoarece relativa

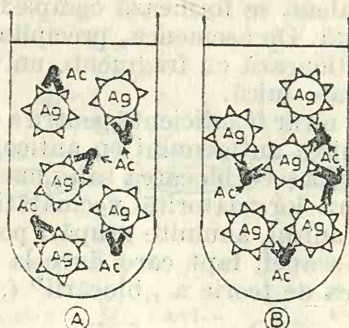


Fig. 45. — Legătura monogamă. A. O moleculă de anticorp IgG se poate lega prin cele două situsuri de doi determinanţi ai aceleiaşi molecule de antigen, mărind puternic forţa legăturii stabilite. Acest fenomen împiedică însă formarea reţelei antigen — anticorp, care apare în mod normal (B) (după J. F. Bach, 1976).

inflexibilitate a celor mai multe molecule de Ig împiedică adaptarea situsurilor lor de combinare la doi determinanţi antigenici situaţi adiacent pe suprafaţa unei singure particule sau celule.

Tehnicile de imunodifuzie

Imunodifuzia se bazează pe capacitatea antigenelor şi a anticorpilor de a migra în geluri de agar purificate sau de agaroză * 1,0—1,5%. Viteza de difuzie, respectiv distanţa parcursă de un reactant, într-o unitate de timp, este direct proporţională cu gradientul său de concentraţie şi invers proporţional cu greutatea moleculară. În cursul difuziei se formează un gradient de concentraţie, în cadrul căruia există o zonă de condiţii optime (zona de echivalenţă) pentru formarea unei benzi de precipitare maximă, mărginită de zonele cu exces de antigen şi respectiv de anticorp. Formarea zonelor de precipitare este dependentă în toate sistemele de imunodifuzie, de concentraţia relativă a antigenului şi anticorpilor. Dacă sistemul analizat prin imunodifuzie conţine un singur antigen şi anticorpul său, se va forma o linie unică de precipitare. Amestecurile de sisteme antigen — anticorp vor genera benzi multiple de precipitare, teoretic chiar o bandă pentru fiecare sistem.

Există şi cazuri excepţionale, cînd două antigene cu viteze de difuzie echivalente migrează împreună în antiserul care conţine anticorpii corespunzători (în concentraţii egale), astfel încît zona concentraţiilor optime (echivalente) este situată în acelaşi plan pentru ambele sisteme. În aceste cazuri, precipitatele lor sînt suprapuse şi înregistrate ca un precipitat unic. Ţinînd seama de aceste excepţii, se poate spune că numărul

* Agaroza este un polizaharid linear neutru, extras din agar, după îndepărtarea agaropectinei. Este impermeabil faţă de molecule > 200 Kdal.

benzilor de precipitare evidențiate în testele de precipitare prin difuzie în gel corespunde numărului minim posibil de sisteme antigen — anticorp funcționale.

Difuzia simplă

Imaginată de Oudin (1946), reacția de difuzie simplă se efectuează depunînd antigenul pe suprafața unei coloane de agar în care, înainte de gelificare, a fost încorporat antiserul. Datorită difuziei, antigenul produce un gradient de concentrație spre partea inferioară a eprubetei, determinînd în zona de echivalență apariția unui disc de precipitat. Banda de precipitare formată inițial se deplasează în jos cu o viteză care depinde de concentrația antigenului în soluție, de concentrația anticorpilor din agar, de porozitatea agarului, de timpul scurs de la montarea experienței și de temperatură. În realitate, acest fenomen este determinat de un proces de dizolvare și de reformare a precipitatului, pînă cînd poziția lui se stabilizează.

După cum s-a demonstrat, pe măsură ce concentrația antigenului crește, în regiunea superioară a gelului se creează o zonă de excedent de antigen, care determină dizolvarea precipitatului. În același timp, deplasarea antigenului în zona de înaintare îl aduce într-o nouă poziție de proporție optimă, care determină apariția unui nou precipitat, în fața benzii vechi de precipitare. Final, precipitatul apare ca o bandă netă, distinctă, cu o slabă neclaritate pe margini.

Tehnica Oudin permite difuzia unui singur reactant, într-o singură direcție, de aceea este denumită sistem de difuzie unică, unidimensională („Single diffusion — single dimension system").

Difuzia simplă radială

Descrisă inițial de Feinberg (1957), este cunoscută în special sub denumirea de tehnica Mancini, după numele celui care, împreună cu Carbonara și Heremans, a perfecționat-o (1965). Se efectuează în plăci și se bazează pe principiul existenței unei relații cantitative între antigenul plasat într-un godeu și inelul de precipitat rezultat după difuzia lui în agarul din jur, care conține antiser (fig. 46).

Inițial, antigenul care difuzează este în concentrație mare și produce complexe solubile. Pe măsură ce difuzează, concentrația lui continuă să scadă pînă cînd ajunge într-o concentrație optimă, zona de echivalență cu anticorpul, în care produce un inel de precipitare, al cărui diametru este proporțional cu concentrația antigenului. Rezultatele se calculează în raport cu o curbă de calibrare construită cu ajutorul unor concentrații cunoscute de antigen.

Tehnica Mancini nu dă indicații calitative referitoare la numărul sistemelor de precipitare în reacție, dar cuantifică cu mare acuratețe diferitele antigene (detectează ~ 1,25 μg). Este utilizată în practică pentru a măsura concentrația unor proteine (α-fetoproteina, componentul C3, transferină), a IgG, IgA și IgM, a componentului secretor etc. Poate fi practicată cu antigene marcate, după principiul autoradiografiei.

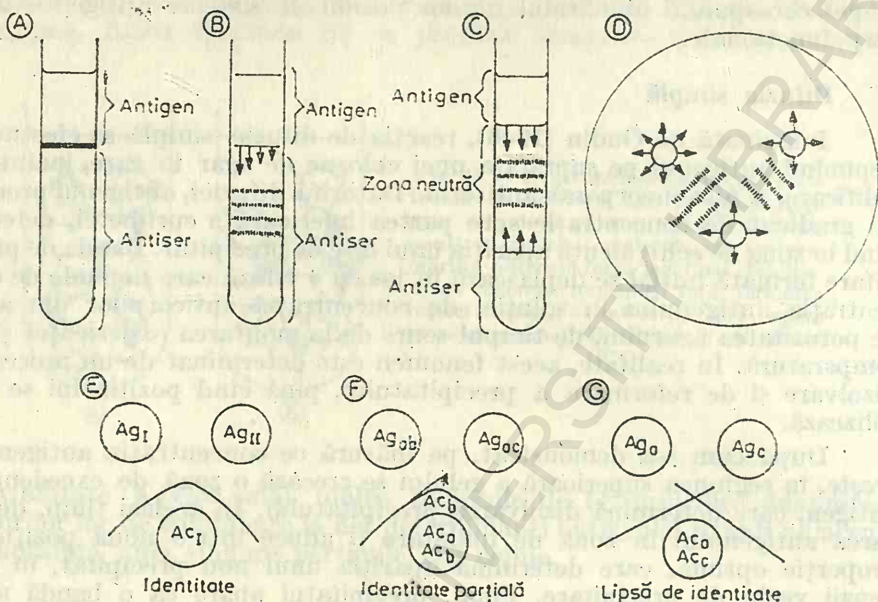


Fig. 46. — A. Reprezentare schematică a unor modalităţi de aranjare a reactanţilor în reacţiile de precipitare prin difuzie în gel, în comparaţie cu reacţia directă în mediu lichid, care produce un inel de precipitat la interfaţa antigen-anticorp. B. Difuzie unidimensională. C. Dublă difuzie unidimensională. D. Dublă difuzie bidimensională. Aspectul liniilor de precipitare în cazul reacţiilor de identitate a antigenelor (E), de identitate parţială (F) şi de neidentitate (G) (după Roitt, 1974).

Dubla difuzie bidimensională

Înlocuirea imunodifuziei în tuburi cu o tehnică modificată, efectuată pe o suprafaţă plană, transparentă, propusă simultan (1948) de Ouchterlony şi Elék, a marcat un progres deosebit datorită numeroaselor avantaje (tehnică simplă, care permite compararea simultană a mai multor antigene şi stabilirea directă dacă două antigene sînt identice sau diferite etc.).

Tehnica Ouchterlony se efectuează, de regulă, pe plăci de sticlă, acoperite cu un strat fin de agar purificat sau de agaroză, iar reactanţii sînt depuşi în godeuri, obţinute prin decuparea gelului de agar. Numărul godeurilor, forma şi poziţia lor sînt adaptate exigenţelor experimentului. După depunerea soluţiilor de antigen şi de anticorp, ele sînt lăsate să difuzeze liber în gel, la adăpost de evaporare (menţinere în „camere umede") şi observate periodic cîteva zile. Benzile de precipitare formate de reacţia antigen — anticorp în zona de echivalenţă devin vizibile în lumină indirectă. Dacă concentraţia anticorpilor este în exces faţă de cea a antigenului şi dacă coeficienţii de difuzie sînt egali, benzile de precipitare se vor forma mai aproape de godeul care conţine antigenul. În cazul excesului de anticorpi, situaţia este inversă (J. F. Bach, 1976).

Fig. 46 prezintă rezultatele imunodifuziei duble obţinute cînd se compară antigenul cunoscut, Ag 1, cu un al doilea, Ag 2, în prezenţa anticorpilor din serul anti-Ag 1. Cele două antigene sînt depuse în godeuri adiacente, care formează un aranjament triunghiular cu godeul care conţine anticorpi. În funcţie de poziţia liniilor de precipitare se pot obţine trei tipuri de reacţii :

Reacţia de identitate corespunde formării unei singure linii de precipitare în formă de arc, derivată în realitate din două linii de precipitare, care au fuzionat la punctul lor de contact. Ea demonstrează că antiserul nu poate deosebi cele două antigene, că ele sînt identice, cel puţin ca reactivitate imunologică. Termenul de ,,identitate'' este deci utilizat cu sensul de identitate serologică, deoarece tehnica nu deosebeşte diferenţele chimice minore, cum sînt cele dintre toxine şi anatoxinele respective.

Reacţia de ,,neidentitate'' corespunde situaţiei în care antigenele Ag 1 şi Ag 2 sînt depuse în godeuri adiacente, în timp ce godeul central conţine anticorpi anti-Ag 1 şi anti-Ag 2. Liniile de precipitare se încrucişează complet, ceea ce înseamnă că cele două antigene au reacţionat cu anticorpi complet diferiţi. Liniile de precipitare produse de cele două sisteme se intersectează, traversîndu-se reciproc.

Reacţia de identitate parţială sau de tip încrucişat corespunde situaţiei în care două antigene, parţial înrudite, reacţionează cu anticorpii dintr-un antiser produs cu unul dintre ele. Banda de precipitare este unică, rezultînd dintr-o fuziune similară celei observate în reacţiile de identitate, cu deosebirea că prezintă o prelungire, ca un pinten (,,spur-like''), la nivelul punctului de fuziune, mai puţin densă decît precipitatul propriu-zis. Această prelungire continuă linia dată de antigenul folosit la producerea serului imun şi este formată din reacţia anticorpilor cu determinanţii antigenici care nu sînt comuni celor două antigene. Cu alte cuvinte, ea este determinată de reacţia dintre determinanţii omologi ai Ag 1 şi anticorpii care nu se combină cu antigenul Ag 2 care dă reacţii încrucişate.

Un al patrulea tip de reacţie, foarte rar, produce ,,pinteni'' dubli şi poate fi relativ uşor confundat cu reacţiile de ,,neidentitate''. În realitate, el corespunde unei *reacţii de dublă identitate parţială.*

În cazul foarte frecvent al sistemelor antigen — anticorp multiple, probabilitatea ca două antigene să producă o singură linie de precipitare este statistic foarte rară. Chiar dacă viteza lor de difuzie (dependentă de g.m. şi de formă) coincide, este improbabil ca anticorpii specifici să fie în aceeaşi concentraţie în ser. Ca urmare, fiecare sistem antigen — anticorp va produce o linie proprie de precipitare. Aceasta permite determinarea numărului de determinanţi antigenici prezenţi în amestec, exceptînd cazul cînd sînt foarte numeroşi.

Tehnica Ouchterlony poate fi folosită pentru analiza semicantitativă a sistemelor serologice umane, în care specificitatea liniilor de precipitare este determinată. Serul este depus într-un godeu central, înconjurat circumferenţial de godeuri care conţin antigenul diluat în serie. Formarea şi intensitatea liniilor de precipitare reprezintă, în mare, o măsură a concentraţiei antigenului. Alternativ, tehnica poate fi utilizată pentru aprecierea titrului precipitant, schimbînd localizarea antigenului cu serul şi invers.

Imunoelectroforeza

Imaginată de Grabar şi Williams (1953), imunoelectroforeza combină avantajele electroforezei (tehnică de separare a proteinelor într-un cîmp electric, ce permite analiza heterogenităţii proteinelor individuale) cu cele ale imunoprecipitării după dublă difuzie în gel. Ea se efectuează în mai multe etape succesive:

1) Acoperirea unei lame de sticlă (plăci) cu gel de agar, care conţine o soluţie de electroliţi (tampon pH 8,2—8,8), cu forţa ionică 0,025, în care se decupează, cu o matriţă, un godeu circular central şi un şanţ paralel cu axul mare al plăcii.

2) După plasarea produsului de examinat (antigenul) în godeu, proteinele din constituţia sa sînt separate electroforetic prin expunerea (30—60 min) la un cîmp electric cu o diferenţă de potenţial de 3,3 v/cm. În această fază, proteinele migrate nu sînt vizibile, exceptînd cazul cînd sînt colorate.

3) Antiserul produs faţă de produsul integral este depus în şanţul paralel cu axul de separare electroforetică a proteinelor, după care antiserul şi produsul de examinat difuzează prin agar unul spre celălalt (~ 18—24 de ore).

4) La locul de întîlnire a antigenului cu antiserul, în zona de echivalenţă, apar linii de precipitare, corespunzînd fiecărei proteine ce poate fi definită antigenic (fig. 47). Liniile de precipitare sînt fotografiate sau (după spălare şi uscare) colorate pentru înregistrare permanentă.

Tehnica se bazează pe principiul că separarea proteinelor dintr-un amestec (spre exemplu, serul sanguin), sub influenţa unui cîmp electric, depinde de sarcina lor electrică netă şi (în mai mică măsură) de mărime.

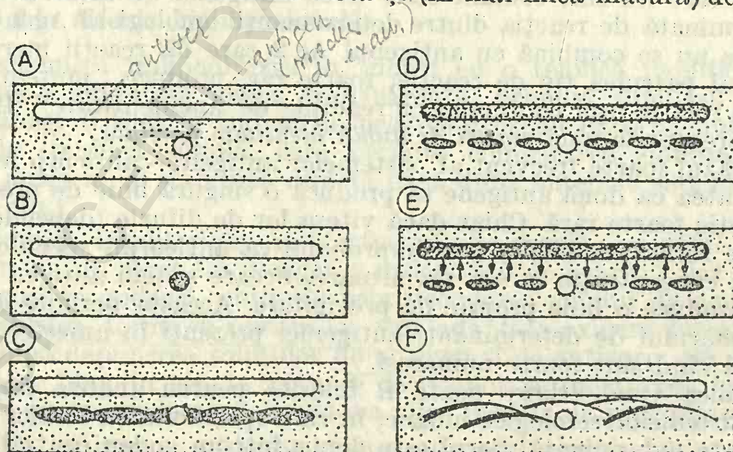


Fig. 47. — Tehnica imunoelectroforezei. A. Agarul semisolid acoperă o lamă de microscop, în care se decupează godeuri pentru antigen şi antiser. B. Godeul pentru antigen este umplut cu ser uman. C. Serul este separat prin electroforeză. D. Godeul pentru antiser este umplut cu antiser faţă de serul total uman. E. Serul şi antiserul difuzează în agar. F. Formarea liniilor de precipitare pentru proteinele serice individuale (după Stites şi colab., 1984).

Cele mai multe proteine au la pH 8,0 o sarcină negativă și, ca urmare, migrează spre anod. Viteza migrării lor în cîmpul electric este, în principal, afectată de forța ionică a soluției-tampon și de natura materialului utilizat ca suport. În condițiile experimentale citate (pH 8,2), agarul este încărcat electronegativ, în timp ce soluția-tampon, care pătrunde în porii și canaliculele din structura lui, este încărcată pozitiv. La aplicarea curentului electric, soluția-tampon va migra spre polul negativ, în timp ce cele mai multe proteine vor migra în sens contrar, spre polul pozitiv. Fenomenul este cunoscut sub denumirea de electroendosmoză. Dacă viteza electroendosmozei este mai mare decît viteza de deplasare a componentelor, atunci acestea vor fi deplasate spre polul negativ, deși sînt încărcate tot negativ. Unele medii (de exemplu, agaroza) nu produc electroendosmoză; ca urmare, în cazul utilizării lor, toate proteinele plasmatice migrează spre anod la pH 8,0. Numărul, forma și poziția liniilor de precipitare depind de constantele de difuzie și de concentrațiile reactanților. Interpretarea lor se face pe baza principiilor dublei difuzii în gel.

Imunoelectroforeza are numeroase aplicații practice în: 1) identificarea cu mare putere de rezoluție a compoenților antigenici din amestecurile lor complexe; 2) identificarea și cuantificarea proteinelor prezente în ser sau în alte lichide biologice; 3) studiul purității antigenelor și anticorpilor; 4) stabilirea claselor de Ig umane. În imunopatologie, permite identificarea Ig de mielom și deosebirea lor de creșterea policlonală a gamaglobulinelor serice, evidențierea prezenței catenei L în urină la bolnavii cu discrazii plasmocitare sau cu tulburări autoimune etc.

Aglutinarea

Propusă ca tehnică de diagnostic de Widal (1896), aglutinarea este reacția antigen — anticorp cel mai frecvent folosită în practică. Ea are la bază interacțiunea determinanților de pe suprafața unor celule sau particule cu anticorpii (aglutinine) și este practicată în diferite variante (pe lamă, în eprubetă sau în plăci de microtitrare).

Aglutinarea directă

Se practică punînd în contact diluții în serie de antiser (de regulă, cu rația 2 sau 10) cu cantități constante de antigen, respectiv cu determinanți antigenici care fac parte din structura normală a unor particule sau celule (hematii, bacterii, fungi etc.).

În cazul celulelor unor bacterii mobile, au fost descrise două tipuri de aglutinare:

1) Tipul H (germ. „Hauch" = Voal), corespunzînd unor flocoane mari și laxe de bacterii aglutinate prin intermediul flagelilor, care apar rapid (după 1—2 ore de incubare) și sînt ușor disociate prin agitare. Antigenele respective (flagelare) sînt termolabile și rezistente la acțiunea formalinei 0,5%.

2) Tipul O (germ. „Ohne Hauch" = fără voal), sub forma unor granule dense, compacte, greu disociabile prin agitare, rezultate din aglutinarea corp la corp a celulelor. Antigenele respective (somatice) sînt termostabile, rezistente la alcool şi sensibile la acţiunea formolului.

Natura anticorpilor aglutinanţi. Aglutinarea depinde de structura moleculară a Ig-anticorp şi, deci, de valenţa lor. În general, ea este evidenţiată cu determinanţii antigenici situaţi pe suprafaţa celulelor şi a particulelor, numiţi adesea aglutinogeni datorită capacităţii lor de a induce aglutinarea. Ei sînt mai puternic imunogeni dacă sînt administraţi în asociere cu particulele sau cu celulele purtătoare decît dacă sînt solubilizaţi.

Moleculele de IgM sînt considerabil mai active decît cele de IgG. Astfel, după Greenbury (1963), pentru a obţine aglutinarea a 50% din hematii sînt necesare de 100 de ori mai multe molecule de IgG decît de IgM. Pe bază moleculară, aceasta înseamnă că pentru a obţine acelaşi efect sînt necesare 25 de molecule de anticorpi IgM fixate pe hematii şi 20 000 de IgG (Pillot, 1974). Onone (1965), utilizînd anticorpi de iepure anti-haptenă, a arătat că pentru a obţine un titru hemaglutinant comparabil este nevoie de 68—180 de ori mai multe molecule de IgG decît de IgM. În sistemele anticorpi — bacterii, IgM este de aproximativ 22 de ori mai eficientă decît IgG.

Mecanismul aglutinării. În mod normal, la pH neutru, bacteriile sînt încărcate electronegativ şi formează o suspensie omogenă datorită forţelor electrostatice de repulsie. Aglutinarea este rezultatul interacţiunilor specifice dintre antigene şi anticorpi, care asigură legarea determinanţilor antigenici de pe suprafaţa unor celule sau particule adiacente. Prezenţa sărurilor în mediu este absolut esenţială pentru anularea forţelor de repulsie dintre celule (prin acţiunea ionilor cu sarcină opusă) şi intensificarea forţelor de atracţie, care permit celulelor să se apropie unele de altele suficient de mult pentru a forma legături specifice. Rezultatul final este formarea de „punţi" de anticorpi între celulele adiacente care sînt aglutinate.

Rolul forţelor ionice este foarte important. Chiar cînd anticorpii sînt legaţi specific, dacă concentraţia sărurilor este prea mică ($<10^{-3}$M NaCl), aglutinarea nu are loc. Cînd concentraţia salină este prea mare, aglutinarea are loc nespecific (în absenţa anticorpilor).

Titrul aglutinării. Rezultatul aglutinării sau titrul său se apreciază în funcţie de diluţia maximă la care se observă. El exprimă numărul unităţilor de anticorpi per unitate de volum în serul originar.

Aglutinarea, ca şi alte metode de titrare serologică are o serie de **dezavantaje**, deoarece:

1) titrul serologic nu reprezintă o măsură a anticorpilor, în unităţi absolute de greutate;

2) determinat chiar în condiţii standard, nu indică nivelul total al anticorpilor în ser, ci numai pe cel al anticorpilor predominanţi. La

titrul final („end-point dilution"), intră în joc numai anticorpii prezenți în cea mai mare cantitate ;

3) nu permite o apreciere obiectivă în compararea a două antiseruri diferite, ci indică doar concentrația relativă a anticorpilor, față de o anumită bacterie. Ca urmare, dacă, spre exemplu, un ser anti-*Salmonella* are titrul 1 : 320, iar altul anti-*Shigella* 1 : 640, nu se poate spune că al doilea ser conține o concentrație dublă de anticorpi specifici față de bacteria cu care a fost titrat, în comparație cu primul.

Ca urmare, în comparația rezultatelor aglutinării, spre exemplu în dinamica evoluției anticorpilor, se consideră ca semnificative diferențele de titru corespunzînd la două sau mai multe diluții.

Factorii care influențează aglutinarea. Reacțiile de aglutinare sînt expuse unor influențe multiple ca :

1) densitatea și aranjarea determinanților antigenici pe suprafața celulelor sau particulelor ;

2) dispoziția situsurilor de combinare ale anticorpilor, în raport cu configurația globală a moleculei lor ;

3) potențialul electric al suprafeței reactanților ;

4) concentrația antigenului în suspensie : concentrațiile mari de antigen favorizează aglutinarea mai rapidă, dar „consumă" mai mulți anticorpi și, în consecință, scad titrul serului ;

5) variațiile de pH în zona acidă sau alcalină influențează specificitatea și/sau titrul aglutinării, care are ca pH optim, pH 7,2 ;

6) concentrația salină a mediului (valoarea optimă 0,15 M (0,875%) NaCl) ;

7) variațiile de temperatură și durata incubației.

Pentru microorganisme, în general, durata incubației inițiale este de 1—2 ore la 37°C, urmată de citirea definitivă a rezultatelor, după 24 de ore, la temperatura camerei sau la +4°C. În cazul reacțiilor de hemaglutinare există anticorpi care aglutinează mai bine la cald, la 37°C, iar alții, naturali, mai eficienți la 20°C. Aglutininele la rece („Cold agglutinins") sau crioaglutininele din pneumonia atipică primară, ca și aglutininele anti-I din anemia hemolitică reacționează intens numai la +4°C.

Datorită acestor influențe, valabilitatea reacțiilor serologice și posibilitatea comparării rezultatelor lor sînt condiționate de efectuarea lor cu aceleași tehnici, în condiții standardizate de mediu și cu reactivi standard.

Anticorpii blocanți și fenomenul de prozonă. Unele seruri aglutinante își pierd această proprietate la concentrații mari de anticorpi și trebuie diluate de 100—1 000 de ori pentru a produce aglutinări evidente. Ele prezintă un fenomen marcat de prozonă (absența aglutinării la diluțiile mici, respectiv la concentrațiile mari de anticorpi). Utilizarea anticorpilor fluorescenți a arătat că la concentrațiile respective, deși

aglutinarea este absentă, bacteriile sînt acoperite cu anticorpi, dar aceștia, deoarece reacționează anormal cu antigenele, nu numai că nu produc aglutinarea, ci chiar o inhibă.

Acești anticorpi inhibitori au fost numiți anticorpi incompleți sau blocanți. Inițial s-a considerat că anticorpii blocanți ar fi univalenți. Caracterul lor bivalent a fost demonstrat indirect, prin capacitatea lor de a determina aglutinarea normală a celulelor pe care au fost absorbiți, dacă reacția este efectuată în prezența albuminei serice, în locul soluției saline, sau dacă hematiile au fost pretratate cu o enzimă proteolitică. Acțiunea anticorpilor blocanți ar putea avea una din următoarele explicații ipotetice :

1) Formarea de legături „monogame" ale anticorpilor cu grupări repetate de pe aceeași suprafață celulară. Acest fenomen s-ar putea datora faptului că în prezența unui exces mare de anticorpi, legarea simultană a celor două situsuri combinate ale aceleiași molecule de Ig, pe două celule diferite, este improbabilă.

2) Localizarea determinantului antigenic în regiuni inaccesibile situsurilor de combinare ale Ig-anticorp. Fenomenul a fost descris în cazul sistemului Rh, la care determinanții antigenici au localizări profunde în interiorul unor cripte de pe suprafața hematiilor (fig. 48).

3) Prezența unor anticorpi cu aviditate slabă de legare.

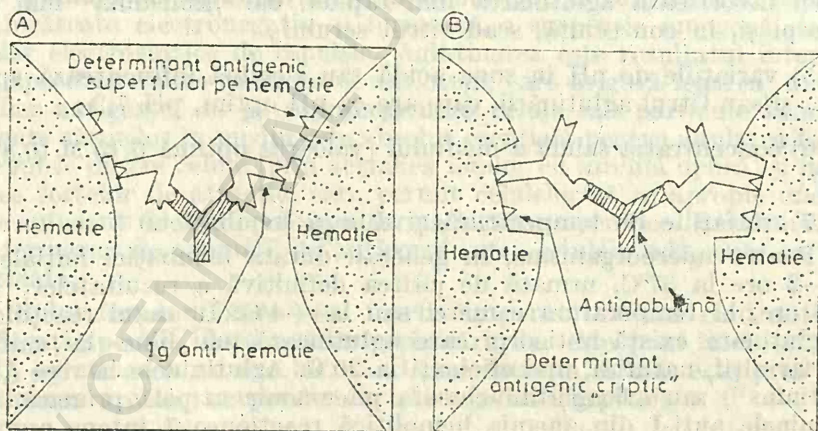


Fig. 48. — Reprezentare schematică a absenței hemaglutinării în anumite sisteme (de exemplu, în sistemul Rh). A. Anticorpul care are două situsuri de legare prea apropiate nu poate reuni doi determinanți antigenici. B. Anticorpul nu poate lega determinanții antigenici localizați în cripte profunde ale suprafeței hematiilor. În ambele cazuri, unirea poate fi asigurată prin intermediul serului antiglobulinic (testul Coombs) (după Bier, 1985).

Aglutinarea indirectă sau pasivă

Observația că reacțiile de aglutinare sînt de 300—700 de ori mai sensibile decît cele de precipitare și pot, ca urmare, decela cantități mult mai mici de anticorpi a stimulat elaborarea unor tehnici bazate pe lega-

rea antigenelor solubile pe suprafața unor particule sau celule și aglutinarea particulelor „sensibilizate" cu ajutorul anticorpilor. Spre deosebire de aglutinarea directă, în care determinanții antigenici sînt constituenti naturali ai suprafeței particulelor sau a celulelor, aglutinarea indirectă se bazează pe principiul adsorbției unor antigene solubile pe purtători pasivi și conversia unei reacții de precipitare într-o reacție de aglutinare. Reacția s-a bazat, de asemenea, pe observația că hematiile adsorb spontan polizaharidele din soluții (Middlebrook și Dubos, 1948). Pretratarea lor cu acid tanic (Boyden, 191), cu clorură de crom sau cu agenți de legare bifuncționali, ca bis-diazobenzidina sau carbodiimida (Arquilla și Stavitsky, 1956), favorizează, printr-un mecanism necunoscut, și adsorbția proteinelor.

Utilizarea hematiilor este avantajoasă, deoarece sînt ușor disponibile, sînt sensibile ca indicatori și pot fi păstrate îndelungat la + 4°C, după tratarea cu formol-glutaraldehidă sau aldehidă piruvică. În general, cu cît cantitatea de antigen adsorbit este mai mare, cu atît este mai mare sensibilitatea reacției. Rezultatul poate fi influențat de structura moleculară a Ig-anticorp. După Stites (1984), IgM este de ~ 750 de ori mai eficientă decît IgG, astfel încît prezența unei concentrații mai mari de IgM poate influența rezultatul reacției.

Reacțiile de aglutinare pot utiliza și alte tipuri de purtători pasivi ca: sferulele de polistiren pentru antigenele polizaharidice și proteinele solubile sau bentonita Wyoming (coloid mineral din pămînt de siliciu), care adsoarbe stabil (pentru 3—6 luni) proteine, glucide sau acizi nucleici.

Aglutinarea pasivă poate fi practicată și după o tehnică „inversă", respectiv prin adsorbția anticorpilor pe suprafața hematiilor sau a particulelor, urmată de aglutinare prin incubare în prezența antigenului.

Reacția de inhibare a hemaglutinării

Hirst (1941) și, independent, Mc Clelland și Hare (1941) au arătat că virusul gripal are capacitatea de a aglutina hematiile de pui de găină. Această proprietate de hemaglutinare directă, determinată de prezența hemaglutininelor pe suprafața particulei virale însăși, poate fi utilizată pentru a detecta prezența unui virus hemaglutinant sau pentru a determina concentrația lui într-o probă.

Reacția de inhibare a hemaglutinării este utilizată pentru a detecta prezența într-un ser a anticorpilor față de un virus hemaglutinant. Reacția se practică amestecînd o cantitate cunoscută de virus cu diluții în serie de ser de bolnav, după care se adaugă hematiile. Dacă serul conține anticorpi specifici, aceștia se vor lega de particula virală și vor împiedica aglutinarea hematiilor. Dacă serul nu conține anticorpi, virusul va produce aglutinarea hematiilor. Reacția are utilizare practică în rujeolă, rubeolă, oreion, gripă, parainfluenza etc.

Hemaglutinarea indirectă se practică prin expunerea hematiilor acoperite cu un antigen la acțiunea unui ser imun specific. Interacțiunea antigenului cu anticorpii din serul imun împiedică hemaglutinarea și determină agregarea și sedimentarea hematiilor. Și, în acest caz, inhibarea hemaglutinării este bazată pe principiul că aglutinarea hematiilor încărcate cu

antigen solubil poate fi inhibată în cazul în care anticorpii reacţionează în prealabil cu antigenul omolog. Lipsa hemaglutinării indică prezenţa antigenului.

Reacţiile de seroneutralizare

Se bazează pe observaţia că serurile imune specifice neutralizează virusurile omologe sau le fac neinfecţioase. Testarea acestui efect se poate face după caz prin inocularea amestecului virus — anticorp pe celule-gazdă indicatoare, ouă embrionate sau la animale sensibile de laborator. Tehnicile bazate pe culturi de celule au două aplicaţii majore: 1) în identificarea unui virus izolat de la bolnavi prin demonstrarea capacităţii unui ser imun specific cunoscut de a-i neutraliza infecţiozitatea; 2) în diagnosticul bolii, prin demonstrarea unei creşteri semnificative a titrului anticorpilor neutralizanţi în perioada tardivă a bolii sau în convalescenţă, comparativ cu cel din faza acută.

Reacţiile antigen — anticorp cu participarea complementului

Cei mai mulţi anticorpi de tipul IgA sau IgM sînt capabili să activeze sistemul complement, declanşînd cascada reacţiilor enzimatice, cu consecinţe importante pentru răspunsul imun: citotoxicitate, imunocitoliză, imunoaderenţă, hemoliză imună etc. Deşi rezultatele finale ale acţiunii sale diferă în fiecare din aceste reacţii, ele au la bază o reacţie iniţială antigen — anticorp, care stimulează intrarea în acţiune a complementului, în urma declanşării căii clasice de activare. Diferenţele semnalate ţin de particularităţile celulelor-ţintă. Hematiile sînt mai sensibile la liză, în timp ce celulele nucleate ale mamiferelor sînt expuse unor reacţii citotoxice cu sfîrşit letal, dar, în general, neasociate cu citoliză.

Reacţia de fixare a complementului (RFC)

Efectuată prima dată de Bordet (1898, 1901), permite detectarea prezenţei şi măsurarea cantităţii de antigen sau de anticorpi dintr-o probă. A fost utilizată în practică, iniţial de Wasserman, Neisser şi Bruck (1906) pentru serodiagnosticul sifilisului, cu ajutorul unui antigen din ficatul de făt sifilitic.

Reacţia foloseşte două sisteme antigen — anticorp, care competiţionează pentru o concentraţie standard de complement. Primul sistem este reprezentat din anticorpi (sub formă de ser de bolnav), un antigen specific corespunzător şi complement. Cel de-al doilea, sistemul indicator, care face vizibil rezultatul reacţiei din primul sistem, constă din hematii de berbec în asociere cu serul imun de iepure antihematii de berbec. Dacă serul conţine anticorpi faţă de antigenul din reacţie, complementul este legat de complexul antigen — anticorp. În aceste condiţii, el nu este capabil să se lege de complexul hematii/hemolizină şi nu poate liza hematiile care vor sedimenta la fundul eprubetei. Dacă serul de bolnav nu conţine anticorpi, complementul rămîne liber şi determină liza hematiilor (fig. 49).

Această comportare este determinată de faptul că complementul nu se combină cu antigenul izolat, are doar o slabă afinitate pentru anticorpi și se leagă numai de complexul antigen — anticorp. Reacția se efectuează în două etape: 1) în prima etapă sînt puse în contact cantități determinate de antigen, diluții succesive din serul de cercetat și complement; 2) după un timp, necesar pentru combinarea antigenului cu anticorpul și, eventual, fixarea complementului, se adaugă sistemul indicator, reprezentat de hematiile de berbec, sensibilizate cu anticorpul respectiv din serul hemolitic.

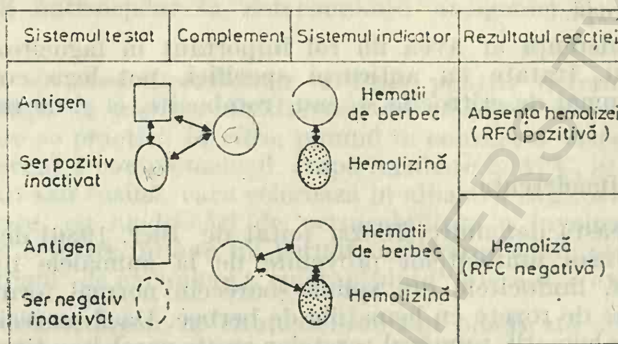


Fig. 49. — Reprezentare schematică a principiului reacției de fixare a complementului.

Hemoliza se poate determina exact spectrofotometric, măsurînd densitatea optică a supernatantului la 591 nm, în funcție de absorbanța hemoglobinei eliberată în mediu, corelată cu numărul hematiilor lezate. Pentru uz clinic, ea se apreciază la nivel de 50% (CH_{50} „Complement hemolysis"), unitate arbitrară, definită drept cantitatea de complement necesară pentru a liza 50% din hematii, în condiții standard de sensibilizare a lor cu anticorpi).

Aplicații practice. RFC este folosită frecvent pentru diagnosticul unor infecții bacteriene sau virale, ca și în practica de laborator. Are o serie de avantaje, decurgînd din posibilitatea utilizării ei cu antigene solubile sau particulate, chiar relativ impure, cu condiția să nu prezinte efecte anticomplementare. Frecvent, în cursul infecțiilor este mai precoce decît aglutinarea și precipitarea. Ea este pozitivă și în cazurile în care proporția dintre antigene și anticorpi este nefavorabilă producerii de agregate, precum și în prezența tipului de anticorpi „incompleți". Utilizarea practică a RFC implică titrarea riguroasă a reactanților, prin tehnica proporțiilor optime, asigurarea riguroasă a condițiilor de mediu (electroliți, pH, temperatură) și a unei cantități standard de hematii de berbec.

Imunoaderența

Reickenberg a demonstrat că tripanosomele și unele spirochete puse în contact cu anticorpii specifici corespunzători, cu complementul și cu o suspensie de plachete (trombocite) formează grămezi vizibile la

microscopul cu fond întunecat. Imunoadeziunea are loc şi cu ajutorul hematiilor de primate nesensibilizate, care pot servi, de asemenea, ca indicatori ai prezenţei complexului antigen – anticorp – complement. La om, fenomenul ar fi determinat de participarea unui receptor distrus de neuraminidază. Studiul efectelor complementului asupra acestui proces a demonstrat rolul critic al componenţilor C1 şi mai ales C3. Imunoaderenţa este produsă şi de complexele EAC 1, 4, 3, EAC 1, 4, 2, 3 şi EAC 4, 3 (E – eritrocite; A – anticorpi; C – complement). Este o reacţie foarte sensibilă, care, pe lîngă aplicaţiile legate de diagnosticul tripanosomiazelor, poate fi aplicată în dozarea C3 şi în detectarea cantităţilor minime de autoanticorpi.

Imunoaderenţa ar avea un rol important în fagocitoză, deoarece unele bacterii, tratate cu anticorpi specifici, pot lega complementul, aderînd nu numai de eritrocite şi/ sau trombocite, ci şi de receptorii macrofagelor.

Imunocitoaderenţa

Sub această denumire, Biozzi (citat de Bier, 1986) descrie rozetele formate în jurul limfocitelor provenite de la animalele imunizate. În mod obişnuit, limfocitele din splina şoarecelui normal formează numai un număr mic de rozete cu hematiile de berbec. Dacă şoarecii sînt imunizaţi cu aceste hematii, numărul rozetelor creşte paralel cu titrul aglutinant al serului.

Fenomenul, datorat anticorpilor produşi la nivel celular, anterior eliberării lor în mediu, este folosit pentru studiul citodinamicii formării lor.

Imunocitoliza

Pfeiffer şi Issaeff (1893) au demonstrat că *Vibrio cholerae* inoculat intraperitoneal la cobaiul imunizat îşi pierde mobilitatea, după care capătă o structură granulară, urmată de bacterioliză. Studiul *in vitro* a arătat că fenomenul necesită prezenţa anticorpilor din serul imun specific şi a complementului. Bacterioliza imună a fost descrisă la mai multe bacterii Gram-negative (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*), în timp ce la bacteriile Gram-pozitive se observă inhibarea multiplicării fără liză concomitentă. În ambele cazuri, efectul citocid depinde de acţiunea secvenţială a componenţilor sistemului complement, dar mecanismul de acţiune este diferit. În cazul bacteriilor Gram-negative, acţiunea combinată a anticorpilor şi complementului determină formarea de sferoplaşti susceptibili la liză, în timp ce în cazul celor Gram-pozitivi, care au un perete gros, sărac în lipide, dezintegrarea şi liza nu pot avea loc, deşi lezarea membranei citoplasmatice are efect bactericid.

Imunocitotoxicitatea

Corespunde procesului în care interacţiunea dintre antigen – anticorp şi complement pe suprafaţa celulară nu determină citoliză, ci activitate citotoxică manifestată prin modificări structurale sau tulburări funcţio-

nale (creșterea permeabilității membranelor, imobilizarea celulelor mobile, alterări metabolice etc.) (Bier, 1986).

Au fost descrise două tipuri de teste:

1) Testele directe au la bază interacțiunea complementului și anticorpilor cu antigenele omologe de pe suprafața celulelor-țintă.

Testul de imobilizare cu Treponema pallidum evidențiază capacitatea serului sanguin de bolnav de a imobiliza o suspensie de treponeme, în prezența complementului de cobai, după 15 — 18 ore la 37°C. Efectul este lent deoarece *T. pallidum* are un înveliș de acid hialuronic, care împiedică accesul anticorpilor la determinanții antigenici de pe suprafața celulei.

Testul de limfocitotoxicitate utilizat pentru determinarea histocompatibilității și selecția donatorilor de țesuturi sau organe pentru transplantare se practică *in vitro*, punînd în contact o suspensie de limfocite cu antiserul și complementul. După incubare la 37°C, se adaugă albastru de tripan sau eozină, care colorează în albastru sau roșu închis numai celulele lezate, cu modificări de permeabilitate a învelișurilor celulare. Membranele celulare intacte nu permit înglobarea colorantului. De aceea testul este numit de excludere a colorantului ("Micro-dye exclusion test").

2) Testele indirecte de citotoxicitate sînt practicate utilizînd fixarea antigenului heterolog pe suprafața unei celule-țintă. Au aplicație în alergologie, în depistarea sensibilității la diferite medicamente (ca, exemplu, în cazul purpurei trombocitogenice, produsă de hipersensibilitatea la chinidină sau la Sedormid (alilizopropilacetiluree (Bier, 1986). Reacția anticorpilor specifici cu medicamentul legat de suprafața plachetelor sanguine este urmată de activarea complementului care determină trombocitoliză și trombocitopenie consecutivă.

Prezența complementului este, de asemenea, necesară în reacțiile de conglutinare și imunoconglutinare, care sînt folosite mai rar.

Reacțiile de imunofluorescență

Utilizarea reacțiilor de imunofluorescență pentru evidențierea antigenelor prezente pe suprafața celulelor a fost propusă de Coons (1942, 1958).

Tehnica se bazează pe proprietatea fluorocromilor de a se lega de Ig, fără a le modifica proprietățile imunologice specifice, în așa fel încît legarea lor de antigenul corespunzător conferă complexului caracterul de fluorescență. Fluorocromii (izotiocianatul de fluoresceină, aminorosamina B, aminorhodamina B etc.) sînt substanțe care iradiate de un fascicul de lumină cu lungime de undă (λ) mică și frecvență mare (lumină de excitație sau de activare cu λ = 3 000 — 4 000 Å), așa cum sînt radiațiile UV, emit radiații cu λ superioară (5 300 — 6 000 Å), situate în zona vizibilă a spectrului. Ele permit formarea unei imagini colorate a comple-

xului antigen — anticorp, care poate fi înregistrată cu ochiul protejat de un filtru pentru UV sau care impresionează placa fotografică. Au fost propuse mai multe tehnici.

Imunofluorescenţa directă

Se bazează pe principiul evidenţierii unui antigen direct, după combinarea lui cu un anticorp marcat cu un fluorocrom. Complexul antigen-anticorp este fluorescent datorită legării anticorpilor cu antigenul solubil sau corpuscular corespunzător (fig. 50). În absenţa antigenului, anticorpii fluorescenţi sînt îndepărtaţi prin spălare.

Imunofluorescenţa indirectă

Deşi este uşor de efectuat, tehnica directă are un dezavantaj major, legat de necesitatea de a conjuga fluorocromii cu anticorpii proveniţi din fiecare antiser utilizat. Aceasta creează dificultăţi cînd trebuie examinat un număr mare de seruri. Tehnica indirectă (Coons şi Kaplan, 1950) evită acest dezavantaj recurgînd la un al treilea component, antiglobulina speciei animale ce a furnizat antiserul specific, care se comportă ca anti-anticorp.

Reacţia, care are avantajul de a utiliza un singur conjugat fluorescent pentru fiecare specie animală, se practică în doi timpi 1) fixarea Ig-anticorp specifice nemarcate pe suprafaţa structurilor antigenice; 2) evidenţierea fixării lor prin adăugarea de ser anti-Ig marcat, care determină formarea unui complex antigen — anticorp + antiglobulină fluorescentă.

Tehnica este mai sensibilă şi fluorescenţa mai pronunţată datorită dimensiunilor mai mari ale complexului şi numărului mare de anticorpi fluorescenţi care se leagă de complexul iniţial (fig. 50).

Imunofluorescenţa în „Sandwich" („Sandwich test")

Este folosită pentru identificarea celulelor din ţesutul limfoid, care produc anticorpi, faţă de un anumit antigen. Celulele fixate cu etanol, pentru a împiedica spălarea anticorpilor, sînt tratate cu antigenul respectiv şi final evidenţiate prin adăugarea unui antiser specific pentru antigen marcat fluorescent. În această tehnică, antigenul este făcut „sandwich" între anticorpii prezenţi pe suprafaţa celulelor şi cei adăugaţi într-un al doilea strat.

Tehnica complementului

Această tehnică propusă de Goldwasser şi Shepard (1958), reprezintă un procedeu de asemenea indirect, în care antigenul de identificat din ţesuturi este pus în contact cu anticorpii dintr-un ser inactivat, o cantitate fixă de complement şi o globulină anticomplement, marcată cu izotiocianat de fluoresceină.

Tehnica permite identificarea antigenului, utilizînd un anticorp cunoscut. Are avantajul utilizării unei globuline anticomplement, preparată de la o singură specie animală.

Tehnicile de imunofluorescență au o mare sensibilitate și o largă aplicație în practică în imunologie, pentru localizarea antigenelor în țesuturi, detectarea situsurilor care fixează antigenele și persistența acestora în organe, evidențierea antigenelor solubile, identificarea celulelor T și B în sînge, detectarea Ig sau a complementului în țesuturi,

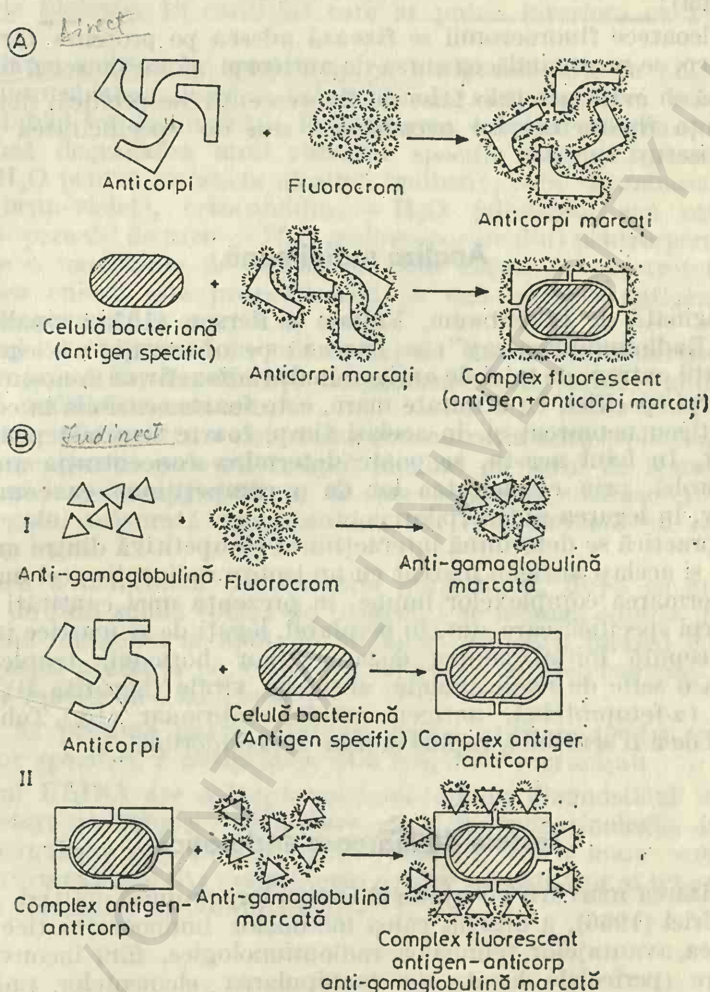


Fig. 50. — Reacțiile de imunofluorescență. A. Metoda directă. B. Metoda indirectă.

identificarea celulelor producătoare de anticorp, a antigenelor tumorale și a celor de transplantare, localizarea hormonilor și a enzimelor, cuantificarea proteinelor serice și anticorpilor etc. Tehnica are aplicații în identificarea virusurilor și a microorganismelor în țesuturi sau culturi. Poate fi utilizată și pentru identificarea bacteriilor în unele medii naturale, ca, de exemplu, în sol (Zarnea, Andreuță și colab., 1966).

Testele de imunofluorescență au și unele dezavantaje, datorită cărora trebuie practicate și interpretate cu prudență:

1) unele țesuturi prezintă autofluorescență galben-verzuie. În aceste cazuri, se recomandă utilizarea unor fluorocromi cu culoare de contrast (rhodamina);

2) deoarece fluorocromii se fixează adesea pe proteine fără funcție de anticorp, se recomandă ca sursa de anticorpi să nu fie serul total;

3) să se evite reacțiile false de fluorescență nespecifică, determinate de prezența fluorocromului necombinat sau de specificitatea redusă a unor antiseruri.

Analiza radioimună

Imaginată de Berenbaum, Yallow și Berson (1958), analiza radioimună („Radioimmunoassay") se bazează pe observația că legarea unei concentrații extrem de mici de antigen înalt radioactiv de concentrații mici de anticorpi specifici, cu afinitate mare, este foarte sensibilă la competiția cu un antigen nemarcat și, în același timp, foarte sensibilă pentru antigenul dat. În felul acesta, se poate determina concentrația antigenelor dintr-o probă, prin capacitatea lor de a competiționa cu componentul radioactiv, în legarea anticorpilor.

În practică se determină interacțiunea competitivă dintre un antigen nemarcat și același antigen marcat cu un izotop radioactiv (cel mai adesea ^{125}I), în formarea complexelor imune, în prezența unei cantități limitate de anticorpi specifici, care sînt, în prealabil, legați de o matrice insolubilă.

Concepută inițial pentru dozarea unor hormoni, tehnica a fost extinsă la o serie de medicamente, antigene virale (hepatită B), antigene tumorale (α-fetoproteină, antigen carcino-embrionar etc.). Tehnica are avantajul de a fi sensibilă, rapidă și ușor reproductibilă.

Testele de marcare enzimatică

Utilizarea marcării cu ajutorul enzimelor, propusă, inițial, de Avrameas și Uriel (1966), a deschis calea metodelor imunoenzimatice, care au majoritatea avantajelor tehnicilor radioimunologice, fără inconvenientele lor majore (pericolele legate de manipularea elementelor radioactive, nevoia de aparatură, prețul relativ ridicat, markeri labili etc.).

Engval și Perlman (1971) au propus un test de titrare imuno-enzimatică specifică numită curent ELISA („*E*nzyme-*l*inked *i*mmuno-*s*orbent *a*ssay"). Tehnica se bazează pe utilizarea unui marker enzimatic legat de un anticorp, de un antigen sau de o haptenă, a cărui prezență permite detectarea unor reacții antigen — anticorp, altfel invizibile, și, eventual, cuantificarea reactanților. În principiu, singura deosebire față de tehnicile radioimunologice și de imunofluorescență este că antigenele sau anticorpii sînt cuplați covalent cu o enzimă, în locul radioizotopului sau al fluorocromului.

Enzimele cel mai des utilizate sînt peroxidaza din hrean („Horse radish peroxydase"), care poate fi obținută în cantitate mare, este stabilă în conjugate, dă rezultate ușor de citit etc., și fosfataza alcalină. Practic poate fi utilizată orice enzimă, dacă este solubilă, stabilă și nu este prezentă în lichidele biologice în cantități care ar putea interfera cu efectuarea testului.

Cuplarea markerului enzimatic cu antigenele sau cu anticorpii se face cu ajutorul unor molecule bifuncționale, care leagă cei doi compuși, pe baza dublei lor reactivități. Evidențierea reacției antigen — anticorp are la bază degradarea unui substrat specific enzimei (paranitrofenil fosfat + H_2O pentru fosfataza alcalină (galben); acid 5-aminosalicilat + + H_2O (brun-violet), ortotoluidina + H_2O (albastru) sau ortofenilen diamină + peroxid de uree + H_2O (galben-portocaliu) pentru peroxidază), urmată de o modificare de culoare ce este măsurată spectrofotometric. Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația antigenelor sau anticorpilor prezenți în soluția de testat.

Testul se efectuează în microplăci de titrare de material plastic, pe baza proprietăților de adsorbție nespecifică a antigenelor și anticorpilor, pe pereții godeurilor acestora.

În principiu, pentru a determina concentrația anticorpilor, antigenul este fixat pe pereții godeurilor, apoi incubat cu serul de testat, căruia i se adaugă antiimunoglobulina, de care s-a legat enzima. Activitatea enzimei legate, măsurată spectrofotometric, este corelată cu cantitatea de anticorp legat.

Pentru a determina concentrația antigenului, după ce anticorpul este legat de faza solidă (placa de titrare), i se adaugă soluția de testat, care conține antigenul și apoi un al doilea anticorp marcat enzimatic. Testul necesită prezența pe antigen a cel puțin doi determinanți, pentru a realiza o reacție în „sandwich".

Fig. 51 prezintă patru strategii uzuale utilizate pentru măsurarea anticorpilor specifici, a antigenelor și a reacțiilor încrucișate.

Testul ELISA are o largă aplicabilitate în diagnosticul infecțiilor virale, bacteriene, fungice, parazitare, ca și în endocrinologie, imunopatologie, alergologie etc. El este relativ simplu, are o mare sensibilitate (ng/ml), utilizează reactivi stabili, este relativ necostisitor și nu are inconvenientele tehnicilor radioimunologice.

Semnificația generală a reacțiilor antigen — anticorp

Reacțiile de serodiagnostic descrise se bazează, în general, pe ideea că agenții patogeni infecțioși declanșează un răspuns imun ce determină o producere de anticorpi în exces față de cantitatea de antigen prezentă în organism. Toate reacțiile serologice măsoară practic acest excedent, care este mai mare dacă antigenul este eliminat din organism. În practică, creșterea excedentului de anticorpi, respectiv a titrului serului, de cel puțin 2—4 ori, în probele recoltate la intervale de 10—14 zile, este semnul

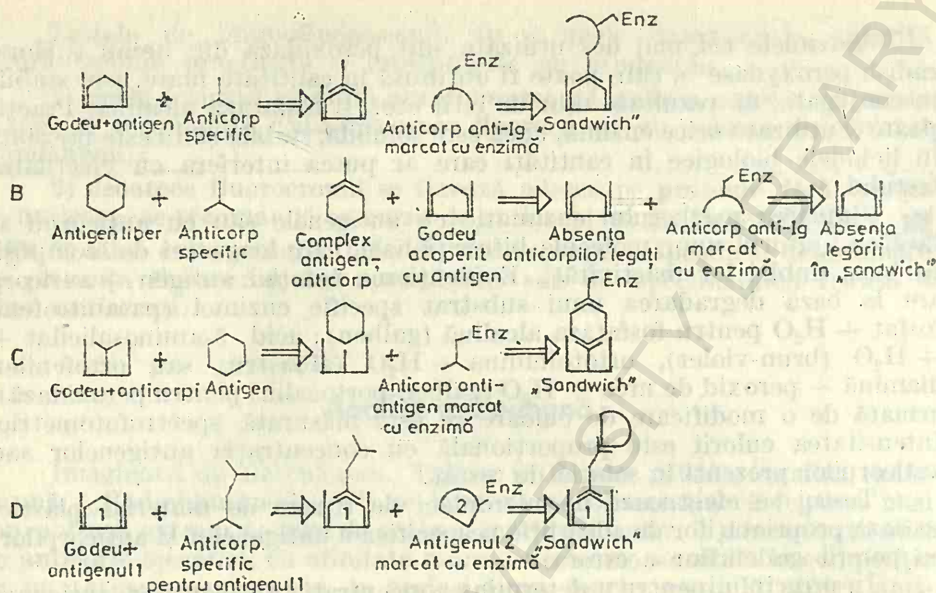


Fig. 51. — Strategiile de detectare a reacţiilor specifice antigen — anticorp utilizînd testul ELISA. A. Legarea directă. B. Inhibarea haptenei. C. Tehnica "sandwich" pentru detectarea antigenului. D. Tehnica "sandwich" pentru detectarea reactivităţii încrucişate a anticorpilor (după Berzofsky şi Berkower, 1984).

unei infecţii în evoluţie. De asemenea, un nivel ridicat stabil indică existenţa unei infecţii recente în antecedente.

Reacţiile de serodiagnostic au unele limite de care trebuie ţinut seamă în interpretarea lor:

1) Producerea anticorpilor poate fi consecinţa unui proces independent de boala existentă. Titrul lor poate să crească în urma unui stimul nespecific (spre exemplu, o sîngerare), a unui răspuns anamnestic faţă de un stimul înrudit sau neînrudit, a unei infecţii de altă natură sau unei vaccinări;

2) Anticorpii produşi în cursul unei infecţii pot fi incompatibili cu antigenele utilizate în anumite teste.

3) Unele boli severe sau cronice sînt asociate cu antigenemie marcată şi, în consecinţă, evoluează aparent fără anticorpi în circulaţie, pentru că nu ajung la un exces sesizabil de anticorpi specifici.

4) Organismele individuale, aparent global imunocompetente, pot fi imunologic incompetente faţă de un antigen anumit şi, ca urmare, nu produc anticorpi specifici.

5) Anumiţi agenţi patogeni pot fi lipsiţi de anumite antigene uzuale sau acele antigene pot să fie neimunogene pentru anumite organisme.

6) Deşi, în general, prezenţa predominantă a IgM este semnul unor infecţii recente, există şi excepţii. Unele infecţii cronice (ca tuberculoza, bruceloza etc.), ca şi unele infecţii virale pot prezenta cinetici diferite, în sensul asocierii stadiilor acute cu IgG şi a celor cronice cu IgM.

Tehnologia hibridomului. Anticorpii monoclonali

„Tehnologia anticorpilor monoclonali a avut un impact deosebit asupra multor domenii de cercetare ca imunologia, microbiologia medicală, parazitologia, fiziologia, biologia celulară, biochimia, biotehnologia industrială, diagnosticul și terapeutica medicală".

O. T. Schönherr, E. H. Houwink

Capacitatea sistemului imunitar de a declanșa un răspuns adecvat față de un număr practic nelimitat de antigene diferite este demonstrată fără echivoc. Datorită acestei particularități, pătrunderea în organism a unui antigen, chiar simplu, mobilizează mai multe clone de celule B, care produc anticorpi cu specificități, afinități și avidități diferite, deoarece fiecare imunogen are determinanți antigenici (epitopi) multipli. Datorită heterogenității răspunsului imun, antiserurile convenționale sînt amestecuri de anticorpi policlonali în cantități și cu calități variabile de la un animal la altul. În mod normal, răspunsul imun monoclonal (în sensul uniformității moleculare) a fost evidențiat numai în mod excepțional (Haber, 1970), deoarece, chiar în cazul unui imunogen „pur", animalele răspund frecvent cu producere de anticorpi față de contaminanți minori. Chiar un antiser puternic și specific, produs prin imunizarea unor animale aparținînd unei linii genetic pure, poate conține anticorpi cu afinități diferite, cu activități biologice diferite și cu reactivitate încrucișată cu alte antigene cu structuri similare. Ceva mai mult, sîngerările consecutive ale aceluiași animal pot furniza seruri cu reactivități imunologice diferite.

Întrucît producerea de seruri imune prin imunizarea animalelor de laborator cu diferite antigene (fig. 52) este un procedeu curent în practica laboratoarelor de microbiologie, imunologie, biochimie și medicale, această heterogenitate a anticorpilor policlonali obținuți prin tehnicile convenționale, clasice, creează numeroase dificultăți:

1) răspunsul imun este imprevizibil chiar la animale din linii pure care pot furniza antiseruri cu caracteristici diferite;

2) purificarea lor prin absorbție este laborioasă și scade evident titrul anticorpilor;

3) producerea unor cantități mari de anticorpi cu calități constante este dificilă sau aproape imposibilă;

4) rezultatele obținute în diferite laboratoare nu sînt comparabile, fapt care creează confuzii și determină rezultate contradictorii.

Milstein și Köhler (1975) au realizat fuzionarea unor celule dintr-o linie celulară de mielom de șoarece, care sintetizau propria lor imunoglobulină omogenă, cu limfocite din splina unui șoarece imunizat cu hematii de oaie (un antigen foarte bun). Au obținut celule hibride, care produceau

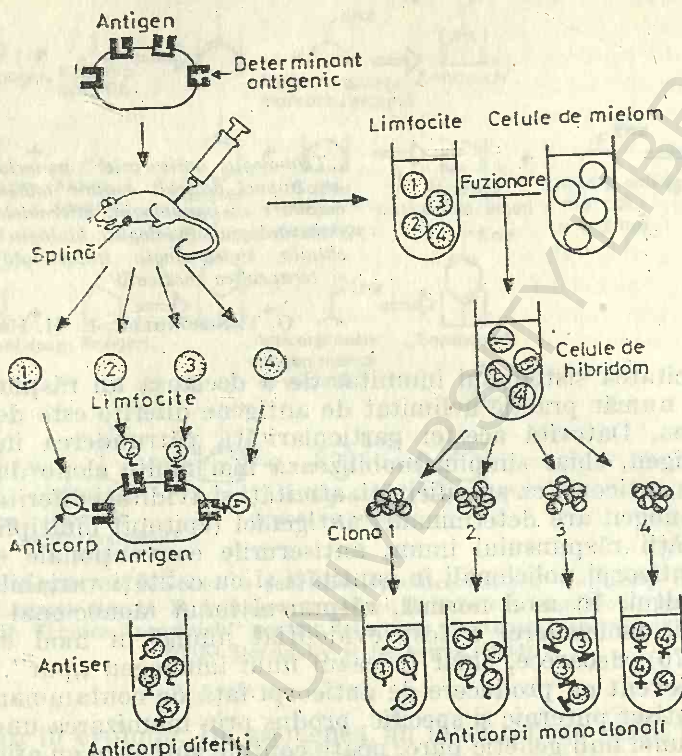


Fig. 52. — Reprezentare simplificată a principiilor ce stau la baza producerii anticorpilor monoclonali. Antigenele care poartă mai mulţi epitopi diferiţi stimulează un număr egal de subpopulaţii diferite de limfocite, fiecare secretînd un tip de anticorp care corespunde unui determinant antigenic unic. Serul imun convenţional conţine un amestec de anticorpi. După clonarea celulelor de hibridom, fiecare clonă secretă un anticorp monoclonal.

imunoglobuline caracteristice ambelor tipuri de Ig sintetizate de celulele fuzionate. Unele dintre ele (2 din 10) sintetizau numai anticorpi antihematii de oaie, permiţînd astfel izolarea unor clone care produceau un singur tip de anticorp. Ulterior au demonstrat că aceste clone fuzionate puteau fi menţinute continuu în subculturi (sînt „nemuritoare").

Noul tip de celule fuzionate a fost denumit *hibridom* (engl. "hybridoma — *hybrid* — myel*oma*"). El exprimă atît proprietatea limfocitului de a produce un anumit anticorp specific, cît şi caracterul de „nemuritor" provenit de la mielom. Produsul a fost repetat cu o gamă largă de substanţe ca haptene, diferite proteine structurale sau enzimatice, glucide, glicolipide, glicoproteine de suprafaţă celulară şi virusuri. Aceste cercetări au demonstrat că tehnologia are aplicabilitate generală. În felul acesta s-a deschis calea *ingineriei anticorpilor* ("Antibody engineering"), definită de Schönherr şi Houwink (1984) ca arta sau strategia de a produce stabil mari cantităţi de anticorpi monoclonali cu calităţi specifice predefinite (fig. 53).

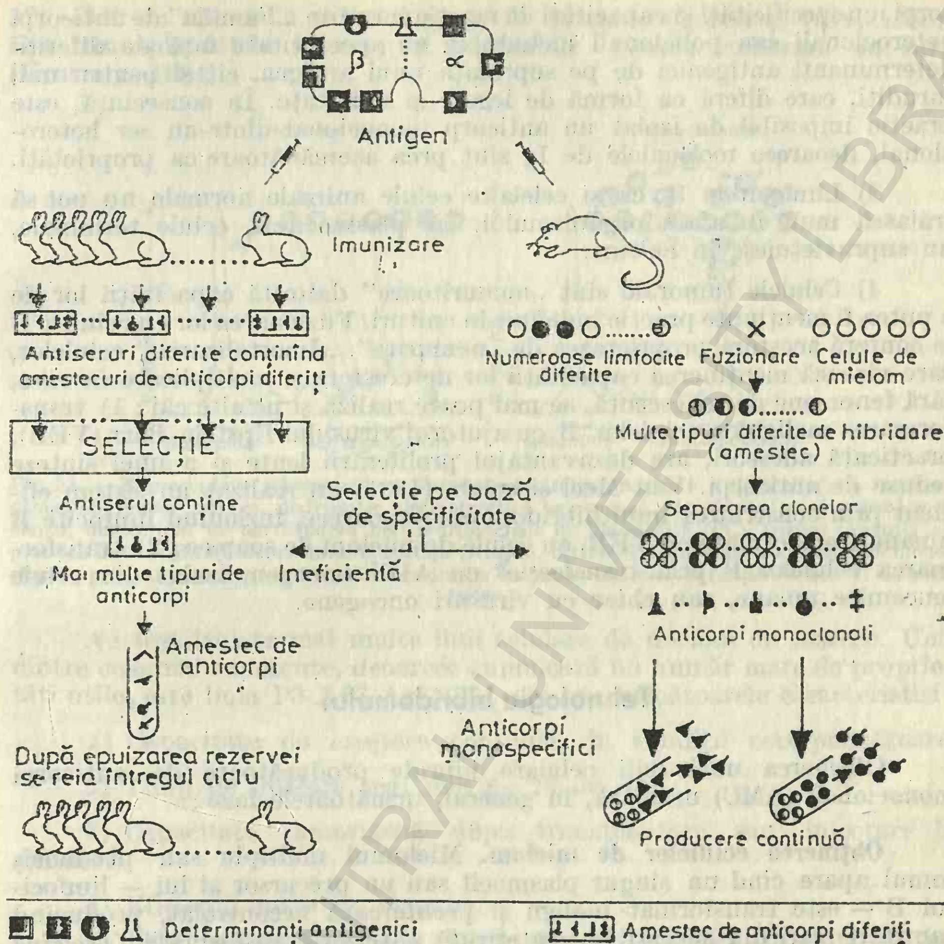


Fig. 53. — Comparație între tehnica anticorpilor monoclonali și tehnicile convenționale de producere a serurilor imune (după Schönherr și Houwink, 1984).

Bazele teoretice ale tehnologiei anticorpilor monoclonali

Tehnologia hibridomului se bazează pe o serie de cunoștințe fundamentale de imunobiologie :

1) Fiecare clonă de limfocite B și plasmocitele derivate din ea, prin proliferare și diferențiere, sintetizează și secretă un singur tip de anticorp, cu o singură specificitate pentru un singur determinant de pe suprafața unui antigen, deci un anticorp monoclonal.

2) Antigenele folosite în metodele clasice de imunizare au practic totdeauna mai mulți determinanți antigenici și, ca atare, stimulează mai multe clone de limfocite și implicit producerea mai multor tipuri de anti-

corpi, cu specificităţi şi capacităţi de reacţie înrudite. „Familia" de anticorpi heteroclonali sau policlonali include Ig cu specificitate faţă de diferiţii determinanţi antigenici de pe suprafaţa unui antigen, cît şi pentru unii înrudiţi, care diferă ca formă de legare şi aviditate. În consecinţă, este practic imposibil de izolat un anticorp monoclonal dintr-un ser heteroclonal, deoarece moleculele de Ig sînt prea asemănătoare ca proprietăţi.

3) Limfocitele B, ca şi celelalte celule animale normale nu pot să trăiască mult în afara organismului, iar plasmocitele, celule terminale, nu supravieţuiesc în culturi.

4) Celulele tumorale sînt „nemuritoare" datorită capacităţii lor de a putea fi menţinute practic indefinit în culturi. Fuzionarea lor cu celulele B le conferă acestora proprietatea de „nemurire". „Imortalizarea" celulelor, care vizează menţinerea capacităţii lor de creştere şi multiplicare *in vitro*, fără fenomene de senescenţă, se mai poate realiza şi pe alte căi : 1) transformarea malignă a celulelor B cu ajutorul virusului Epstein-Barr (VEB), practicată adeseori, are dezavantajul proliferării lente şi a unei sinteze reduse de anticorpi. Van Meel şi colab. (1985) au realizat un sistem eficient prin construirea unui hibridom om — şoarece, fuzionînd limfocite B umane transformate cu VEB, cu celule de mielom de şoarece ; 2) transformarea celulelor B prin transfecţie* cu ADN oncogen, izolat din celule leucemice umane, sau chiar cu virusuri oncogene.

Tehnologia hibridomului

Obţinerea unei linii celulare hibride producătoare de anticorpi monoclonali (AMC) urmează, în general, următoarele faze :

Obţinerea celulelor de mielom. Mielomul multiplu sau plasmocitomul apare cînd un singur plasmocit sau un precursor al lui — limfocitul B — este transformat malign şi proliferează necontrolat, producînd cantităţi mari din aceeaşi Ig, sintetizată anterior transformării *(proteina de mielom)*. Paternul electroforetic al serului unui bolnav de mielom (fig. 54) reflectă un răspuns monoclonal. De aceea, prezenţa unei cantităţi mari de Ig electroforetic omogene este un semn important pentru diagnosticul bolii. Spre deosebire de plasmocitele normale, care sînt celule terminale, celulele de mielom au caracter malign şi continuă să prolifereze practic indefinit (sînt „nemuritoare"), sintetizînd o cantitate mare de Ig aparţinînd unui tip unic (Ig monoclonală).

Plasmocitoamele pot apărea spontan, dar cu o frecvenţă foarte mică la şoarecii bătrîni, aparţinînd anumitor linii genetice. Un progres deosebit a fost înregistrat în urma cercetărilor lui Potter şi Boyce (1962), Potter (1967, 1982), care au arătat că mielomul poate fi indus la şoarecii din liniile BALB/c şi NZB, prin injectarea de uleiuri minerale sau de Pristane (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecan), intraperitoneal. Tumorile apar după

* vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 404.

120—300 de zile de la prima injecţie de Pristane (Potter şi Wax, 1983), sînt transplantabile *in vivo* şi adaptabile pentru cultivare *in vitro* (Kearney, 1984).

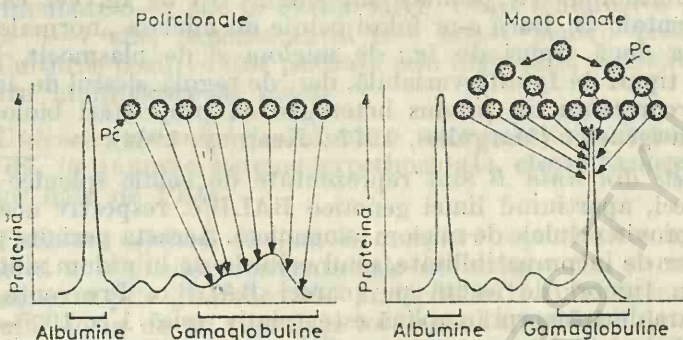


Fig. 54. — Reprezentare schematică a distribuţiei electroforetice a anticorpilor în regiunea gamaglobulinelor. Stînga, distribuţie electroforetică heterogenă, tipică pentru răspunsul policlonal, determinat de participarea mai multor clone de plasmocite (PC), fiecare capabilă să producă anticorpi faţă de un anumit epitop. Dreapta, distribuţie omogenă a anticorpilor monoclonali, produşi de o clonă unică plasmocitară, la un bolnav de mielom (după Yelton şi Scharf, 1980).

Au fost izolate mai multe linii celulare de mielom de şoarece. Una dintre cele mai cunoscute, deoarece cumulează un număr mare de proprietăţi utile, este linia P3-X63-Ag8.653, care are următoarele caracteristici:

1) Capacitate de creştere continuă, în condiţii corespunzătoare.

2) Timp de dublare mai mic de 24 de ore.

3) Capacitate tumorigenă după transplantare sau injectare la şoarece.

4) Eficienţă mare de clonare.

5) Este incapabilă să facă sinteza enzimei HGPRTaza (*hi*poxantin-*g*uanozin-*f*osfo*r*ibozil-*t*ransferaza), care este implicată în sinteza nucleotidelor. Ea catalizează reacţia bazelor hipoxantina şi guanina cu 5-fosforibozil-1-pirofosfatul, pentru a forma nucleotidele inozin-5'-P (IMP) şi guanozin-5'-P (GMP). Acest caracter este obţinut prin cultivarea celulelor de mielom în prezenţa 6-thioguaninei sau 8-azaguaninei (20 μg/ml), care sînt incorporate în structura acizilor nucleici de HGPRTază, determinînd moartea celulelor respective. Supravieţuiesc numai celulele de mielom mutante $HGPRT^-$ (Littlefield, 1964).

6) Nu produc enzima timidin-kinaza (TK). Cele două enzime, HGPRT şi TK, nu sînt necesare în condiţii normale de cultură. Dacă însă calea principală de sinteză a purinelor şi pirimidinelor este blocată cu aminoproteină sau cu metothrexat, celulele mor. Celulele de mielom $HGPRT^-$ şi TK^- supravieţuiesc numai dacă prin fuziune cu o celulă normală redobîndesc capacitatea de a sintetiza cele două enzime.

7) Au o frecvenţă relativ mare de fuziune cu limfocitele (respectiv splenocitele de şoarece) ($\sim$1 la 10^4—10^6 splenocite) (Kearney, 1984).

8) Linia P3-X63-Ag 8.653 reprezintă în acelaşi timp o variantă somatică de celule de mielom care a pierdut capacitatea de a sintetiza atît catene H, cît şi L de imunoglobuline proprii. În felul acesta, după fuziune, hibridomul va produce un singur tip de Ig, cel caracteristic celulei parentale B. Dacă s-ar folosi celule de mielom „normale", hibrizii ar sintetiza două tipuri de Ig: de mielom şi de plasmocit. Frecvenţa celor două tipuri de Ig este variabilă, dar, de regulă, destul de importantă pentru a reprezenta un produs heterogen ca proprietăţi biologice şi de legare a antigenelor (Margulies, 1977; Kearney, 1984).

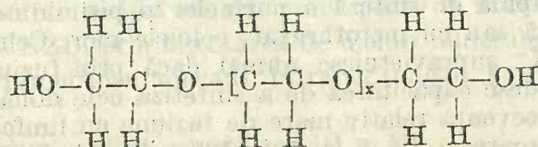
Celulele din linia B sînt reprezentate de celule splenice provenite de la şoareci, aparţinînd liniei genetice BALB/c, respectiv aceleiaşi linii de la care provin celulele de mielom (singenice). Aceasta permite prevenirea fenomenelor de incompatibilitate, cînd celulele de hibridom sînt cultivate ulterior, ca tumori de ascită pe şoareci BALB/c. Frecvenţa celulelor producătoare de anticorpi în splină este relativ mică 1×10^{-3}—1×10^{-5}. Utilizarea splenocitelor are ca scop obţinerea de celule B, care se divid activ şi se diferenţiază la plasmocite, fiecare dintre ele producînd un anumit tip de anticorp, corespunzător unui determinant antigenic. Clark şi colab. (1983) preferă utilizarea splinei de şobolan, pentru că hibridomul obţinut, după fuziune cu celule de mielom de şobolan, este mai stabil, iar anticorpii obţinuţi au proprietăţi fixatoare de complement ca şi anticorpii de tip uman. În prealabil, animalele sînt imunizate cu antigenul dorit, după un protocol variabil, în funcţie de natura antigenului şi altor condiţii speciale.

În general, antigenele de suprafaţă şi celulare sînt foarte imunogene, comparativ cu antigenele solubile în soluţii apoase (polipeptide, glucide, steroizi etc.). Imunogenitatea acestora poate fi crescută prin cuplarea cu „purtători" macromoleculari ca hemocianina KLH, prin asociere cu adjuvantul Freund complet (10—100 µg), la prima injecţie, sau prin incorporare în liposomi, iscomi etc. Calea preferată de imunizare este cea peritoneală, la fel de activă ca şi cea intravenoasă, fără ca să predispună la riscurile acesteia. După injecţii repetate (săptămîni sau luni), se recomandă o injecţie de rapel, cu cîteva zile înainte de sacrificarea animalelor, deoarece s-a remarcat, că celulele blast fuzionează mai eficient decît cele în repaus (Stahli, 1980).

Fuziunea se realizează punînd în contact splenocitele *viabile*, obţinute prin degradarea mecanică a splinei recoltată aseptic, cu celule de mielom, în proporţie de 5—10 : 1. Stimularea procesului se poate realiza pe mai multe căi:

1) *Tratarea cu polietilenglicol* (PEG) reprezintă tehnica folosită cel mai frecvent, deşi mecanismul de acţiune este necunoscut.

Formula chimică a polietilenglicolului pentru g.m. 1 000 dal [x = 25]:



Amestecul de celule, menţinut 3—8 minute în 0,2—0,5 ml PEG (controlat ca să fie atoxic), cu g.m. 1 000—4 000 dal, în concentraţie 40% (v/v), la 37°C şi pH 7,5—8,0, este ulterior diluat cu 30 ml de mediu (Pontecorvo, 1976). Celulele spălate sînt depuse în godeurile unei plăci de microtitrare şi incubate 5—7 zile în mediul HAT. După schimbarea mediului şi reincubare 5—7 zile, supernatantul este testat pentru prezenţa anticorpilor. Culturile pozitive sînt păstrate prin îngheţare, reclonate şi propagate pentru multiplicare în masă.

2) *Utilizarea virusului Sendaï* sau a unor substanţe chimice (dimetilsulfoxid) dă, în anumite sisteme experimentale, efecte fuziogene comparabile celor date de PEG.

3) *Fuziunea celulară dirijată de receptori* reprezintă o îmbunătăţire semnificativă a tehnicilor convenţionale de fuziune (Lo şi colab., 1984). Ea se realizează prin „îmbrăcarea" limfocitelor B cu antigenul corespunzător tipului de Ig de pe suprafaţa lor, legat în prealabil de molecule de avidină. Ulterior, sînt puse în contact cu celule de mielom de suprafaţa cărora s-au legat molecule de *biotină*. Afinitatea avidinei pentru biotină transformă fuziunea dintr-un proces aleatoriu, puţin eficient, într-un proces controlat, foarte specific şi cu randament mare (McCoullough, 1986).

Într-un studiu comparativ, Boys şi colab. (1984) au demonstrat că limfocitele din sîngele periferic au o capacitate mai mică de fuzionare decît cele din diferite organe solide (splină, ganglioni, amigdale etc.). Cauza acestor deosebiri nu este cunoscută.

Produsul iniţial al fuziunii celulare este un *heterokarion*, celulă cu doi sau mai mulţi nuclei diferiţi, incluşi într-o citoplasmă comună, un amestec al celor două tipuri de citoplasmă parentale (fig. 55). În cursul primelor diviziuni, celulele pierd din cromosomi, astfel că numărul lor

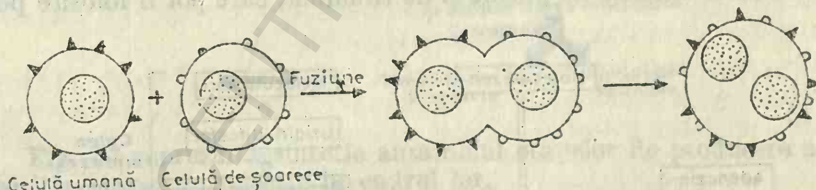


Fig. 55. — Fuziunea celulelor umane şi murine produce un heterokarion multinucleat, pe suprafaţa căruia cele două tipuri de antigene (evidenţiate cu ajutorul anticorpilor fluorescenţi) rămîn localizate pe jumătatea de membrană corespunzătoare. După 40 min, la 37°C, antigenele migrează în planul membranei fluide şi sînt amestecate pe suprafaţa celulei fuzionate (după Raff, 1976).

iniţial de 112 (40 de la limfoblaştii B şi 72 de la celule de mielom) este redus la un număr mai mic şi mai stabil (~ 70—80/hibrid). În această fază a clonării, care corespunde unui proces de eliminare ("purging") roteinele codificate de cromosomii pierduţi încetează a mai fi sintetizate în celulă (Seiler şi colab., 1985).

4) *Selecţia celulelor de hibridom.* Amestecul de fuziune conţine celule splenice şi de mielom nefuzionate, „hibrizi" splină × splină şi mielom × mielom, precum şi celule de hibridom (splenocite × mielom) (Seiler şi colab., 1985). Procesul de selecţie vizează separarea celulelor dorite, de hibridom, şi eliminarea sau distrugerea celulelor nedorite şi a celor hibride neutilizabile. Selecţia este un proces complex, care constă din mai multe etape: a) preselecţia celulelor de hibridom producătoare de anticorpi; b) clonarea lor repetată pentru a obţine clone progene omogene, cu creştere stabilă şi proprietăţi funcţionale utile; c) selecţia hibridomului cu calităţile specifice predefinite (Schönherr şi Houwink, 1984; Kearney, 1984). Clona stabilizată şi selecţionată este îngheţată în azot lichid, unde poate fi păstrată timp practic nelimitat şi reintrodusă în culturi, la nevoie.

Bazele moleculare ale procesului de selecţie

Sistemul de selecţie adoptat, în mod uzual, se bazează pe cultivarea amestecului de fuziune în mediul HAT (*h*ipoxantină, *a*minopterină, *t*imidină). În acest mediu, splenocitele normale şi hibrizii splină × splină, care au, prin natura lor, o durată de viaţă limitată, mor în 1—2 săptămîni, copleşite de celulele de mielom, care se dublează numeric la fiecare 17—24 de ore. Celulele de mielom nefuzionate şi hibrizii mielom × mielom, care sînt „nemuritoare" trebuie însă îndepărtate selectiv din amestec, pentru separarea celulelor de hibridom utile.

Sistemul de selecţie se bazează pe două condiţii experimentale:

1) Aminopterina, omolog al acidului folic, prezentă în mediul HAT, blochează sinteza purinelor şi a pirimidinelor, şi, prin aceasta, biosinteza acizilor nucleici. Ea împiedică sinteza *de novo* a purinelor, pe calea inozinmonofosfatului şi, de asemenea, metilarea dezoxiuridinmonofosfatului la dezoxitimidinmonofosfat (fig. 56). În aceste condiţii, celulele devin dependente de surse externe de purine şi de timidină, care pot fi folosite pentru

Fig. 56. — Reprezentare schematică a căilor principale (*de novo* şi de „recuperare") implicate în sinteza ADN, utilizate în selecţia celulelor de hibridom. HGPRT — hipoxantin-guanin-fosforibozil transferaza.

sinteza ADN pe calea de recuperare („Salvage pathway"). Hipoxantina din mediul HAT poate fi convertită de HGPRT-ază, iar timidina poate fi fosforilată la TMP și apoi la TTP de timidinkinază.

2) Celulele de mielom din linia celulară folosită sînt incapabile să sintetizeze HGPRT-ază și în consecință mor. În mediul HAT vor supraviețui și se vor multiplica în condiții corespunzătoare, teoretic indefinit, numai celulele de hibridom, deoarece ele produc hipoxantin-guanin-ribozil transferază, codificată de genomul splenocitelor și au caracterul de „nemuritoare", codificat de genomul celulelor de mielom. Pentru a preveni reversia liniilor celulare prin retromutație la rezistența la aminopterină se recomandă ca, periodic, celulele de mielom să fie cultivate în prezența 8-azoguanidinei.

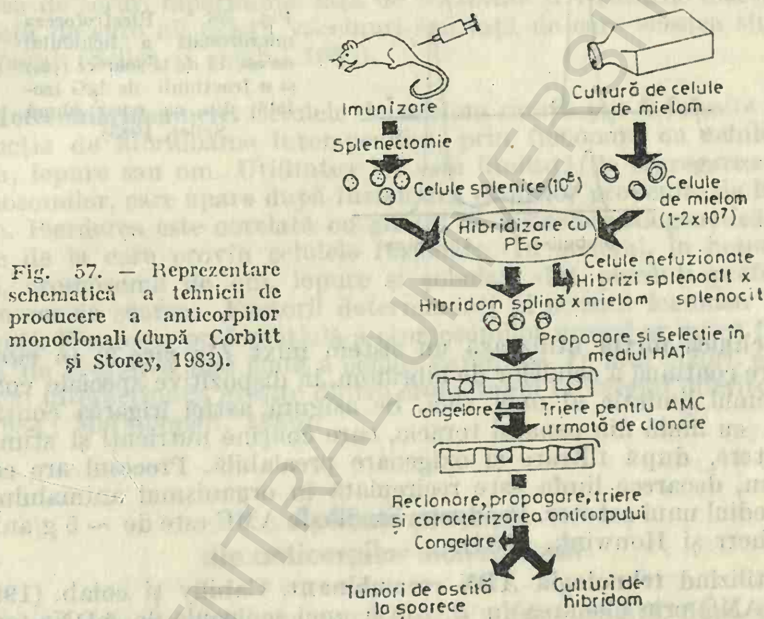


Fig. 57. — Reprezentare schematică a tehnicii de producere a anticorpilor monoclonali (după Corbitt și Storey, 1983).

Fig. 57 reprezintă sintetic ansamblul etapelor de producere a AMC și poziția etapei de selecție în cadrul lor.

Producerea anticorpilor monoclonali

Biosinteza anticorpilor în celulele de hibridom se poate realiza prin tehnici diferite, *in vitro*, *in vivo* sau mixte.

Tehnicile de cultivare in vitro includ o mare varietate de procedee, de la culturile stabile, în flacoane standard de laborator, culturi cu perfuzie continuă cu mediu proaspăt, la culturi în masă, în bioreactoare de 1 000 l, sau prin microîncapsularea celulelor de hibridom în „perle" de polimeri, cu porozitatea și grosimea membranei controlate.

Tehnica de cultivare in vivo, cea mai simplă, constă în inocularea intraperitoneală a 2×10^6 celule de hibridom, care produc 3–10 ml de lichid de ascită. Tehnica are avantajul că permite două sau mai multe recolte, dacă şoarecii supravieţuiesc. Aproximativ 50% din proteinele lichidului de ascită sînt reprezentate de anticorpii monoclonali (Seiler şi colab., 1985) (fig. 58). Riscul de contaminare cu virusuri murine restrînge însă utilizarea terapeutică (Merchant, 1983).

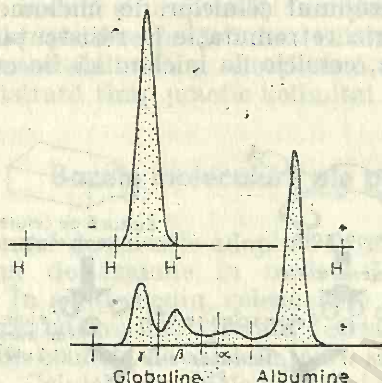


Fig. 58. — Electroforeza microzonală a lichidului de ascită de la şoarece (jos) şi a fracţiunii de IgG izolată din ea (sus) (după Seiler, 1985).

Tehnica mixtă utilizează un sistem mixt (*in vivo* şi *in vitro*) de cultivare continuă a celulelor de hibridom, în dispozitive speciale conectate cu sistemul limfatic al unei vaci. Se asigură astfel irigarea continuă a culturii cu limfă din canalul toracic, care conţine nutrienţi şi stimulatori de creştere, după filtrare şi oxigenare prealabilă. Procesul are caracter continuu, deoarece limfa este recirculată în organismul animalului, prin intermediul unui cateter. Producţia medie de AMC este de ~ 5 g/animal/zi (Schönherr şi Houwink, 1984).

Utilizînd **tehnologia ADN recombinant**, Cabilly şi colab. (1984) au produs AMC prin clonarea in *E. coli* a unei molecule de ADNc (complementar)*, preparat utilizînd ARNm pentru Ig din celulele de hibridom. Anticorpii monoclonali produşi pe această cale nu sînt glicozilaţi şi au o activitate mai slabă *in vivo*. Construirea unei gene funcţionale, capabilă să asigure glicozilarea Ig, de către Gillies şi Tonegawa (1985), ar putea face din clonarea genelor, prin tehnici de inginerie a genelor, metoda de elecţie pentru producerea masivă de AMC.

Randamentul producerii de AMC este variabil, în funcţie de tipul de hibridom şi de sistemul de producere folosit (Boyd şi colab., 1984). În funcţie de aceşti factori, viteza de secreţie variază între 75 şi 6 000 molecule de Ig/celulă/secundă (Fazekas de St. Groth, 1983). După Yelton şi Scharff (1980), cel mai bun hibridom produce 100 μg/ml în lichide de cultură şi ~ 10 mg/ml în lichidul de ascită.

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 561.

Hibridomul de tip uman a fost produs pentru prima dată de Olsson şi Kaplan (1980) şi ulterior de Sikora şi colab. (1982). Necesar pentru producerea AMC utilizaţi în terapeutică (pentru a evita antigenitatea anticorpilor de proveniență murină), el se realizează cu multe dificultăţi. Se utilizează trei procedee: 1) transformarea malignă a celulelor B cu virusul Epstein-Barr; 2) fuziunea celulară, ca în hibridomul murin; 3) producerea de *xenohibrizi* (heterohibridoame) între limfocite B umane şi celule de mielom de şoarece.

Pe lîngă dificultatea obţinerii celulelor B umane stimulate, a căror activare trebuie efectuată *in vitro*, există o serie de probleme necunoscute, determinate de faptul că sistemele celulare umane nu lucrează identic cu cele murine. Producerea şi utilizarea AMC de tip uman este indicată pentru obţinerea de seruri hiperimune faţă de bacteriile şi virusurile foarte patogene, faţă de care nu există vaccinuri sau faţă de care acestea sînt greu de preparat (Seiler şi colab., 1985).

Heterohibridoamele. Celulele de mielom murin pot fi folosite pentru construcţia de hibridoame interspecifice, prin fuzionare cu celule B de şobolan, iepure sau om. Utilitatea lor este limitată de segregarea rapidă a cromosomilor, care apare după fuzionarea celulelor provenite de la specii diferite. Pierderea este corelată cu gradul de deosebire filogenetică dintre speciile de la care provin celulele fuzionate. În general, în heterohibridoame, cromosomii de om, iepure şi şobolan sînt pierduţi preferenţial faţă de cei de şoarece. Factorii determinanţi ai acestui fenomen nu sînt cunoscuţi. Pierderea preferenţială a cromosomilor umani ar putea fi determinată de creşterea mai lentă a celulei parentale. În alte cazuri, ar putea interveni interacţiunile greşite dintre cromosomii cu origini diferite (Kearney, 1984; McCullough, 1986).

Aplicaţii practice ale anticorpilor monoclonali

Producerea de anticorpi monoclonali a fost urmată, după un timp foarte scurt, de aplicaţii importante în numeroase domenii ale ştiinţelor biomedicale, ca şi în industria biologică.

Studiul moleculelor de membrană celulară. Proteinele membranare sînt greu de studiat, deoarece sînt prezente în cantităţi mici, greu de purificat şi adesea lipsite de activitate biologică măsurabilă. Frecvent, activitatea lor este distrusă în cursul procedeelor de extracţie şi purificare. Existenţa AMC, adevăraţi reactivi standard, permite accesul la structuri biologice a căror prezenţă este greu sau deloc accesibilă cu metodele biochimice sau imunologice clasice.

Fig. 59 prezintă schematic modul în care AMC pot demonstra, foarte specific, prezenţa unui antigen caracteristic pentru suprafaţa unei celule, caracterizarea şi cuantificarea lui într-o populaţie celulară şi sugerează modul în care utilizînd un număr relevant de AMC poate fi „inspectată" şi descrisă o suprafaţă celulară (Seiler şi colab., 1985). Detectarea inter-

acţiunii dintre AMC şi determinanţii antigenici de suprafaţă celulară se poate realiza prin marcarea directă a AMC cu fluoresceină sau rhodamină, prin tehnici de imunofluorescenţă indirectă sau prin testele RIA, ELISA sau de rozetare, care, în general, sînt mai laborioase, mai complicate şi nerecomandabile pentru testele de rutină.

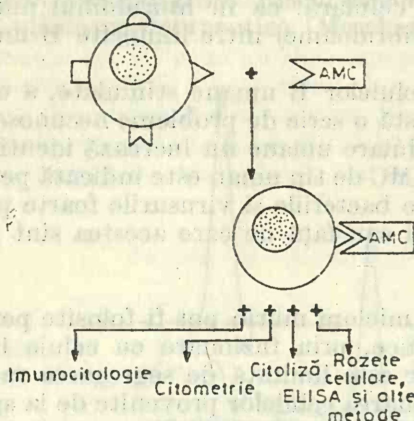


Fig. 59. — Reprezentare schematică a tehnicilor de utilizare a anticorpilor monoclonali (AMC) faţă de antigene legate de celule. Numai unul din cei patru determinanţi de pe suprafaţa celulei este recunoscut de AMC şi astfel poate fi cuantificat (permiţind determinarea numărului celulelor care îl poartă). AMC sînt marcaţi direct sau indirect (după Seiler, 1985).

Aplicaţii în imunologie. AMC permit identificarea populaţiilor de celule limfoide şi mieloide atît în ţesuturile normale, cît şi după infiltrarea lor în ţesuturile organelor bolnave. Spre deosebire de tehnicile convenţionale de caracterizare a leucocitelor pe baze morfologice sau funcţionale (inducţie de mitogeni, efecte citotoxice etc.), utilizarea AMC a permis stabilirea netă a relaţiei dintre fenotipul unui limfocit şi funcţia lui. S-a demonstrat posibilitatea evidenţierii antigenelor de diferenţiere, respectiv a determinanţilor antigenici de suprafaţă celulară, specifici pentru anumite tipuri de celule individuale, sau comune unor populaţii sau subpopulaţii de tipuri celulare sau, în sfîrşit, exprimate numai tranzitoriu în cursul unei anumite faze din ontogeneza unor celule (fig. 60).

Astfel, utilizarea AMC a permis urmărirea ontogenezei normale a celulelor T şi B de la celulele-stem din organele limfoide primare, pînă

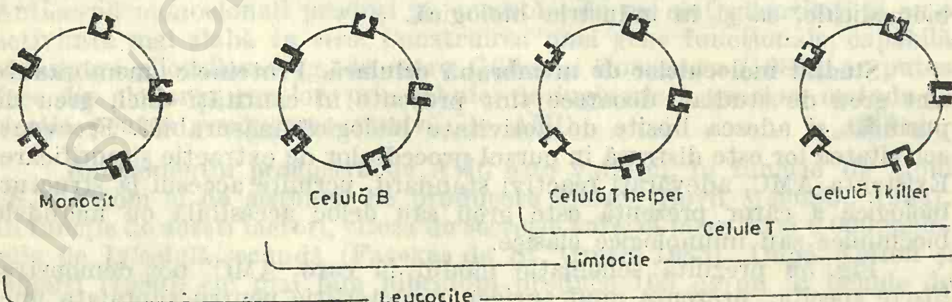


Fig. 60. — Reprezentare schematică a antigenelor de diferenţiere prezente pe patru tipuri de leucocite. Ele apar sub forma unor determinanţi antigenici specifici unor tipuri celulare individuale sau comuni unor populaţii sau subpopulaţii de tipuri de celule (după Milstein, 1980).

la celulele efectoare din sîngele periferic și caracterizarea exactă a diferitelor stadii de diferențiere. A devenit posibilă stabilirea relației dintre fenotipul principalelor tipuri de celule T și funcțiile lor T_H ($T4^+$), T_C/T_S ($T8^+$), precum și rolul lor în cursul tulburărilor complexe din imunodeficiențele primare și dobîndite, în diagnostic și chiar în tratament (Schlossman și Goldstein, 1979). S-a demonstrat, de asemenea, că, în unele cazuri, antigenele recunoscute cu AMC nu sînt numai markeri structurali pentru o funcție importantă a celulei, ci sînt, uneori, direct implicați în funcția respectivă, de exemplu, ca receptori.

Prin consens internațional, în cadrul unei conferințe asupra antigenelor de diferențiere a leucocitelor umane, care a avut loc la Boston (1984), pentru a caracteriza diferitele stadii de diferențiere cu ajutorul AMC, au fost elaborate grupe de diferențiere CD (*D*ifferentiation *c*lusters), care conțin mai multe tipuri de AMC, cu specificitate mai riguroasă. Grupele de diferențiere tind să înlocuiască denumirile originare, din nomenclatura individuală, propusă de diferitele instituții, laboratoare sau firme, folosită încă în literatura de specialitate (tabelul nr. 23).

Tabelul nr. 23

Principalele tipuri de anticorpi monoclonali utilizate pentru clasificarea leucocitelor umane (după Conferința asupra antigenelor de diferențiere a leucocitelor umane, Boston, 1984)

Cluster de diferențiere (CD)	Tipul celulei și antigenul	Populația celulară caracterizată	Anticorpii selecționați cu specificitatea definită de cluster *
CD 1	Thy, p 45–12	Timocitele corticale	T6; M241; SK/9 Leu 6
CD 2	T, p 50	Limfocitele T, care formează rozete-E	T11; G6; S2/Leu 56
CD 3	T, p 19–29	Limfocitele T mature	T3, BW264/56; SK7/Leu 4
CD 4	T, p 53	Subpopulație de celule T; predominant T_H	T4; BW264/123 MT321(BMA040(
CD 5	T, p 76	Toate limfocitele T; subpopulație de celule B	T1; T101; UCHT2
CD 6	T, p 120	Limfocitele T mature; subpopulație de celule B	T12.1; T4 111; 12.1.5
CD 7	T, p 41	Toate limfocitele T	3A1A; 4A, 4H9/ Leu 9
CD 8	T, p 32–33	Predominant T_C și T_S	T8; BW135/80; UCHTA(BMA 031)

Tabelul nr. 23 (continuare)

Cluster de diferențiere (CD)	Tipul celulei și antigenul	Populația celulară caracterizată	Anticorpii selecționați cu specificitatea definită de cluster *
CD 9	nT—nB, p. 24	Monocite	BA2
CD 10	nT—rB, p 100	Celule per-B, polimorfonucleare	J5; VIL—A1
CD 11	M, G	Monocite, granulocite; unele celule din măduva oaselor	Ki—M5 (BMAD 0350) VIM-12
CD 15	G	Granulocite	VIM-C6 (BMAO 200)
CD 16	G, NK	Granulocite, celule NK (receptor Fc)	BW243/41; VEP 13(BMA070); BW209/2
CD 25	T	Limfocite T activate	TAC; T1A

* Thy = timocit; T=celula T; nT, nB= nonT, nonB; M = monocite, macrofage; NK = celule natural killer; p = proteină.

Utilizarea AMC ca reactivi de diagnostic in vitro și in vivo. Numeroase cercetări au demonstrat posibilitatea „construirii" de hibridoame, cu anumite scopuri particulare, și utilizarea AMC obținuți în foarte variate tehnici de diagnostic.

1) *În virologie și microbiologie*, utilizarea AMC permite: a) diagnosticul in rabie pe frotiurile de celule cerebrale provenite de la animalele infectate (Wiktor și colab., 1980); b) determinarea antigenelor de suprafață pentru hepatita B (AgHBs) în serul uman; c) evidențierea și caracterizarea variațiilor antigenice ale virusului gripal (Richman și colab., 1981); d) diagnosticul rapid (~ 30 min.) al bolilor transmise sexual *(Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia*, herpes genital) etc., facilitînd diagnosticul și cercetările epidemiologice, în general, în viroze și bacterioze.

2) *Diagnosticul sarcinii* cu AMC murini anti-hCG *(h*uman *g*onadotrophin *c*horionic), în urină sau în ser.

3) *În infarctul miocardic* (Khaw și colab., 1980). Utilizarea AMC marcați radioactiv permite detectarea miozinei cardiace, precum și localizarea și caracterizarea leziunilor.

4) *Depistarea precoce a anomaliilor genetice* fetale, ca, de exemplu, trisomia 21, răspunzătoare de apariția cazurilor de mongolism cu evidențierea celulelor fetale în singelem atern.

5) *Testarea compatibilității la grefe*, în primul rînd pentru antigenele de histocompatibilitate cel mai frecvent întîlnite (HLA-A2 și HLA-B7).

6) *În diagnosticul și tratamentul bolilor maligne utilizarea AMC* a permis o largă gamă de aplicații : a) identificarea celulelor maligne în sîngele periferic și în măduva oaselor, precum și aprecierea numărului lor ; b) definirea unui număr important de antigene specifice anumitor tipuri de tumori (melanom, carcinom colorectal, neuroblastom, leucemie limfoidă etc.) ; c) evidențierea tumorilor și metastazelor lor prin „scanning" radiologic, după injectarea unor mici cantități de AMC specifici marcați radioactiv, care se localizează în sau în jurul tumorii.

Utilizarea AMC în terapeutică s-a realizat, pînă în prezent cu titlu experimental, în limfomul Burkitt, în rabie, tetanos (Boyd și colab., 1984), în infecții cu *Pseudomonas*, rezistente la antibiotice, pentru neutralizarea specifică a unor substanțe ajunse în concentrații toxice (intoxicații cu medicamente, digitală ș.a.), abuz de droguri. S-a demonstrat că AMC față de virusul febrei aftoase inhibă adsorbția acestuia pe celulele sensibile, neutralizînd infecțiozitatea virusului și inducînd modificări conformaționale, ce duc la pierderea ARN genomic, în așa fel încît virionii apar pe electronografii ca particule goale (McCullough, 1986). Anticorpii monoclonali au fost folosiți ca imunosupresori, în urma transplantelor de organe, în bolile autoimune și alergice, ca și în reacțiile grefă contră gazdă.

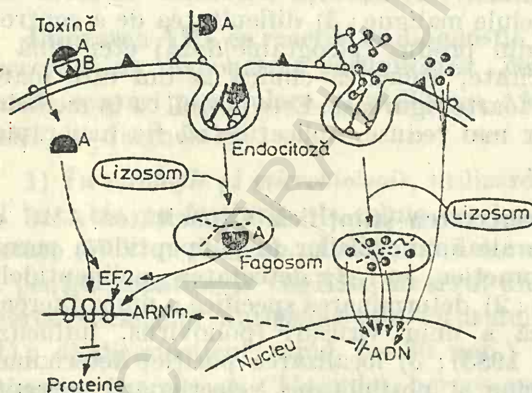
Utilizarea terapeutică este îngrădită de o serie de factori : 1) succesul limitat de obținerea de AMC umani ; 2) absența criteriilor de securitate în utilizarea AMC, produși de celule maligne ; 3) dificultatea de a controla și limita cantitatea de ADN din produs (picograme/doză) etc. Pînă la rezolvarea condițiilor de securitate, aplicarea clinică la om este foarte restrictivă și limitată la condiții foarte riguroase. Este posibil ca în medicina veterinară, datorită exigențelor mai reduse, aplicațiile să fie mai rapide (Schönherr și Houwink, 1984).

AMC ca instrumente în cercetarea științifică. Capacitatea AMC de a recunoaște secvențe specifice ale aminoacizilor în polipeptide a permis realizarea multor obiective practice ca : 1) detectarea polipeptidelor oncogene (Tabin și colab., 1982) ; 2) determinarea specifică a unor diferențe minore în structura antigenică a unor virusuri (poliovirus, influenza, rabie etc., Osterhaus și colab., 1983) ; 3) localizarea poziției determinanților antigenici în unele proteine și posibilitatea selecționării secvenței specifice de aminoacizi, esențială pentru producerea de vaccinuri sintetice (Sutcliffe și colab., 1983) ; 4) în tehnologia genelor pentru izolarea unor fragmente de ADN din „băncile de gene" clonate în *E. coli* ; 5) diferențierea diferitelor categorii de celule cu ajutorul sortatoarelor de celule de mare performanță (~ 50 000 celule/minut), prin marcarea structurilor celulare de suprafață cu AMC fluorescenți (Hoffman și Hanjen, 1981). Utilizarea AMC a permis, de asemenea, studiul structurii și variabilității anticorpilor, respectiv al variabilității situsurilor de legare, a diferitelor regiuni ale Ig implicate în unele funcții efectoare specifice etc.

Utilizarea AMC în biotehnologie. AMC permit purificarea înaltă a unor substanțe proteice. După Milstein (1984), purificarea cu AMC este

de 5 000 de ori mai mare decît cu tehnicile convenţionale de imunoadsorbţie. În practică, AMC imobilizaţi pe suporturi solide (obişnuit „perle" glucidice, incluse în coloane imunoadsorbante) sînt utilizaţi pentru purificarea interferonilor şi a α-fetoproteinelor. Proteinele utile sînt reţinute pe coloană, în timp ce impurităţile o traversează. Ulterior, proteinele dorite sînt eluate şi colectate cu ajutorul modificărilor de pH sau al concentraţiei sărurilor. Procedeul necesită utilizarea de AMC cu afinitate redusă, pentru a face legarea reversibilă şi a facilita eluţia.

Imunotoxinele. Sînt agenţi citotoxici care se pot lega de o celulă-ţintă specifică, prin intermediul situsului de legare al unui anticorp, pentru a interfera cu metabolismul acesteia, determinîndu-i moartea. Experimental s-au folosit anticorpi monoclonali de şoarece, care au fost cuplaţi cu toxine de tipul ricină, abrină sau toxină difterică. Aceste toxine sînt formate din doi componenţi moleculari diferiţi : *catena A*, care condiţionează activitatea toxică, şi *catena B*, care conţine situsul de legare pentru receptorii de pe suprafaţa celulei-gazdă. Pentru a evita interacţiuni nedorite, decurgînd din legarea toxinei cu alte celule, diferite de cele ţintă, catena A este legată de AMC, după ce catena B a fost îndepărtată sau după ce situsul său principal de legare a fost inactivat sau blocat. Imunotoxina reacţionează iniţial cu antigenele de pe membrana celulei-ţintă, formînd un complex antigen — anticorp — toxină care este endocitat (fig. 61).



▲ Receptor △ Antigen celular • Agent citostatic

Fig. 61. — Reprezentare schematică a mecanismului de acţiune *in vivo* a imunotoxinelor şi agenţilor citostatici (după Seiler şi colab., 1985). A. Catena A, toxică a toxinei, B. Catena B (situsul de legare de celulă a toxinei). EF2 f—factorul de creştere a catenei polipeptidice.

Principiul citotoxic este eliberat în fagosom, de unde trece în celulă pentru a inhiba sinteza proteinelor sau replicarea ADN. Cuplarea cu AMC conferă specificitate de acţiune toxinelor naturale. Metoda este foarte utilă pentru distrugerea celulelor-ţintă care poartă pe suprafaţa lor un număr mic de antigene, deoarece cîteva molecule de toxină sînt suficiente pentru a produce moartea (Seiler şi colab., 1985).

Conjugatele medicamente — anticorpi monoclonali sînt construite pe acelaşi principiu şi au fost produse, în special, pentru vehicularea unor

agenţi citostatici. Pot fi utilizate substanţe cu g.m. mică de tipul adriamicinei, care aparţine grupului antraciclinelor, daunomicinei, methotrexatului etc., care inhibă diviziunea celulară. Agenţii citostatici pot fi cuplaţi, în principiu, direct de AMC. Efectul favorabil este condiţionat de legarea finală de celula tumorală a unui număr mare de molecule de citostatic, pentru a inactiva sau bloca >99,99% din celulele-ţintă (Poncelet şi colab., 1984). Pentru a evita legarea de anticorpi a unui număr mare de molecule toxice, care diminuă activitatea de legare specifică a Ig, Ghose şi colab. (1983) recomandă „încărcarea" citostaticelor pe o moleculă-purtător şi apoi legarea acesteia de AMC. Strategia de legare a toxinelor şi citostaticelor de AMC trebuie să nu prejudicieze activitatea toxică şi respectiv de legare a celor doi componenţi. De asemenea, este necesar să asigure, în mod reproductibil, formarea de conjugate stabile, să aibă un randament satisfăcător, iar legătura dintre toxic şi anticorp să fie clivabilă, după ce s-a produs endocitoza în fagosom.

Tehnica are unele limitări: 1) deşi AMC de şoarece îndeplinesc condiţiile de afinitate şi specificitate, ei pot fi antigenici pentru om, la care este indicată utilizarea AMC de tip uman; 2) variabilitatea antigenelor de pe suprafaţa celulei-ţintă reduce eficienţa legării şi implicit a efectului citotoxic; 3) adsorbţia nespecifică pe celule-„neţintă" poate determina efecte nedorite şi consecinţe negative.

Imunolipozomii. Lipozomii sînt vezicule artificiale alcătuite din fosfolipide naturale sau sintetice, aranjate în straturi duble concentrice. Ele delimitează un spaţiu central, în care pot fi „încapsulate", datorită impermeabilităţii lipozomilor pentru soluţiile apoase, o mare varietate de molecule hidrosolubile, inclusiv macromolecule naturale şi medicamente. Legarea lipozomilor încărcaţi cu substanţe terapeutice (citostatice etc.) de AMC — şi transformarea lor în *imunolipozomi* — le „ghidează" drumul spre anumite celule-ţintă, conferind specificitate legării de acestea şi interacţiunii dintre medicament şi celulă, după endocitoză (Sullivan, Connor şi Huang, 1986).

Avantajele tehnologiei hibridomului. În realizarea diferitelor aplicaţii practice, tehnologia hibridomului oferă o serie de avantaje deosebite în raport cu tehnologiile clasice de producere şi purificare a anticorpilor:

1) Celulele de hibridom pot fi clonate individual şi fiecare clonă sintetizează şi secretă anticorpi cu specificitate unică, pentru un singur determinant antigenic.

2) Ele proliferează rapid şi necontrolat, producînd $> 10^9$ celule/animal (şoarece).

3) Produc cantităţi mari de anticorp. Concentraţia Ig în lichidul de ascită este de cîteva mii de ori mai mare decît la animalele imunizate.

4) Clonele individuale de celule selecţionate pot fi menţinute indefinit, prin subculturi, în culturi de celule sau prin inoculare la animale sensibile. Pot fi conservate prin îngheţare şi recuperate, în vederea reluării producţiei de AMC la nevoie.

5) Spre deosebire de antiserurile convenţionale, care reprezintă amestecuri variabile de reactivi, ce nu pot fi reproduse identic după epuizarea stocului originar, AMC reprezintă un reactiv chimic bine definit şi reproductibil, după necesităţi. Tehnica asigură posibilitatea obţinerii unui produs identic în toate laboratoarele din lume.

6) Tehnologia furnizează un model experimental cu ajutorul căruia pot fi „construite" în laborator hibridoame destinate unor scopuri speciale. Practic, orice celulă care produce o substanţă utilă (interferon, insulină etc.) poate deveni o „fabrică" pentru substanţa respectivă *in vivo* sau *in vitro*, după fuziunea cu o celulă tumorală.

Potenţialul tehnologiei AMC este apreciat de unii cercetători ca fiind asemănător celui al ingineriei genelor. Obstacolele actuale sînt de ordin tehnic. Ele ţin de faptul că hibridoamele sînt mai greu de cultivat decît bacteriile sau levurile modificate prin tehnici de inginerie a genelor şi prin procedee mai costisitoare. Utilizarea terapeutică a AMC necesită punerea la punct, prealabilă, a unor teste de inocuitate („Safety test") perfect valabile în cazul administrării la om a unui produs obţinut prin participarea unei celule tumorale. Datele actuale, obţinute în numai 15 ani de la punerea la punct a tehnicii de producere a AMC, demonstrează rolul ei în rezolvarea multor probleme fundamentale ale imunobiologiei, în îmbunătăţirea testelor de serologie şi imunologie, în general, în diagnosticul şi tratamentul multor boli.

SISTEMUL FAGOCITAR ȘI FAGOCITOZA

„În cazul microorganismelor patogene există un paralelism strîns și constant între intensitatea fagocitozei și rezistența la infecții. Nu există exemplu de vindecare fără intervenția fagocitelor. Digestia intracelulară asigură nimicirea germenilor".

J. BORDET

„Monocitul și urmașul său diferențiat, macrofagul, și-au părăsit în ultimii ani situația de „măturător" umil nespecific pentru cea de celulă rafinată, cu o activitate secretorie intensă, capabilă să transmită informații".

J. PITT

Introducere

Fenomenul de fagocitoză a fost descoperit în anul 1882 de Metchnikoff, care a dat numele generic de fagocite („celule care mănîncă") celulelor libere sau fixe ce au capacitatea de a îngloba în citoplasma lor particulele fine cu care vin în contact și de a le distruge, printr-un proces de digestie intracelulară, ori de cîte ori natura chimică a acestora le face accesibile enzimelor fagocitului.

Fagocitoza este foarte răspîndită în scara animală, ingestia și digestia intracelulară avînd o semnificație fiziologică multiplă, dependentă de complexitatea organismelor. Astfel, dacă la om și la animalele superioare fagocitoza asigură, printre altele, captarea și distrugerea agenților patogenici pătrunși în organism, la protozoare și la metazoarele primitive, ea reprezintă mecanismul lor de nutriție, constînd din înglobarea și digestia particulelor, urmată de eliminarea părților nedigerabile. În afară de aceasta, fagocitele sînt implicate în metamorfoza nevertebratelor și a vertebratelor inferioare, realizînd resorbția celulelor distruse. În sfîrșit, la organismele superioare, fagocitele joacă și rolul de „măturător" prin aceea că înglobează și digeră celulele devenite inutile, pe cele cu viață scurtă și pe cele care au murit sub acțiunea unui agent patogen, contribuind astfel la eliminarea unor resturi organice nefolositoare ori nocive și reintroducînd, în economia generală a organismului, unii dintre constituenții lor chimici.

După Rabinovitch (1969), fagocitele se grupează în două categorii majore :

1) *Fagocitele „profesioniste"* adaptate prin definiție să ingere particule străine, în tot cursul existenței lor ca stadii mature (efectoare). Ele sînt purtătoare de receptori specifici de imunoglobuline (fac imunofagocitoză) și de complement. Această categorie include *sistemul fagocitar mononuclear* (monocitele și macrofagele) și *sistemul fagocitar polimorfonuclear*, reprezentat de neutrofile și, după Klebanoff (1985), și de eozinofile.

2) *Fagocitele „neprofesioniste"*, lipsite de receptori, reprezentate de fibroblaști, celulele reticulare și endoteliale, care exercită această funcție facultativ, ingerînd numai cantități mici de particule străine, fără intervenția Ig sau a sistemului complement.

Sistemul fagocitar mononuclear

(Pl. 4—7)

„Denumirea de macrofag, consacrată prin uz, definește mai mult un ansamblu de funcții particulare, decît un tip de celule autonome".

R. Fauve

Macrofagul a fost descris inițial de Metchnikoff (1887, 1892), utilizînd drept criteriu principal capacitățile sale speciale de fagocitoză, care îl deosebesc de leucocitele polimorfonucleare neutrofile („microfage"). Ulterior, Aschoff (1924) l-a încadrat în sistemul reticuloendotelial (SRE), împreună cu alte celule avînd origine, morfologie și funcții comune, deși difereau cantitativ și calitativ în raport cu stadiul lor de diferențiere și cu localizarea în organism. Această clasificare avea meritul de a oferi un cadru conceptual larg, de a reuni într-un sistem celule diferite, dar avînd proprietăți (funcții) identice. SRE a fost criticat, în principal, pentru că reunea celule care nu fac parte în prezent din sistemul fagocitar mononuclear. Între acestea sînt de menționat celulele reticulare din splină și ganglionii limfatici, celulele endoteliale și fibroblaștii, care nu au origine comună cu macrofagii, nu au potențial fagocitar ridicat, nu fac imunofagocitoză (nu au receptori de Ig) etc. (van Furth, 1972). Încadrarea macrofagului în sistemul reticulohistiocitar (Volterra, 1927) a fost, de asemenea, criticată pentru că nu modifica esențial situația.

Conceptul de sistem fagocitar mononuclear

În anul 1972, pe bază de consens, grupul de experți special creat al Organizației Mondiale a Sănătății, coordonat de van Furth, a propus crearea *sistemului fagocitar mononuclear*, pentru a reuni toate celulele mononucleare dotate cu mare putere fagocitară, precum și celulele lor de origine indiferent de forma, mărimea și localizarea lor. În acest sens, din sistemul fagocitar mononuclear (SFM) fac parte: celula-matcă „angajată", monoblastul, promonocitul, monocitul și macrofagele din ficat (celulele Kupffer), histiocitul din țesutul conjunctiv, macrofagele libere și fixe din ganglionii limfatici, histiocitele și macrofagele din măduva oaselor, din cordoanele pulpei roșii splenice, macrofagele alveolare din pulmon, macrofagele din cavitățile seroase (pleurale, peritoneale, sinoviale), celulele microgliale din sistemul nervos, osteoclastele din țesutul osos etc. (fig. 62). Se adaugă macrofagele din exsudate, macrofagele stimulate („elicited macrophage") și activate, celulele multinucleare gigante (celulele Langhans) și celulele cu corp străin („foreign body type") prezente în orice țesut inflamat (vezi cap. „Inflamația").

Din această enumerare rezultă că unele macrofage sînt situate intra- sau juxtavascular (celulele Kupffer, macrofagele din pulpa roșie splenică, din măduva oaselor, din sinusurile limfatice), în timp ce altele sînt interstițiale (în țesutul conjunctiv, pulmon, sistemul nervos, țesutul osos, seroase etc.) Ca urmare, denumirea de macrofag nu se referă la un anumit tip celular bine definit, ci la un grup de celule diferite, avînd funcții fiziologice asemănătoare.

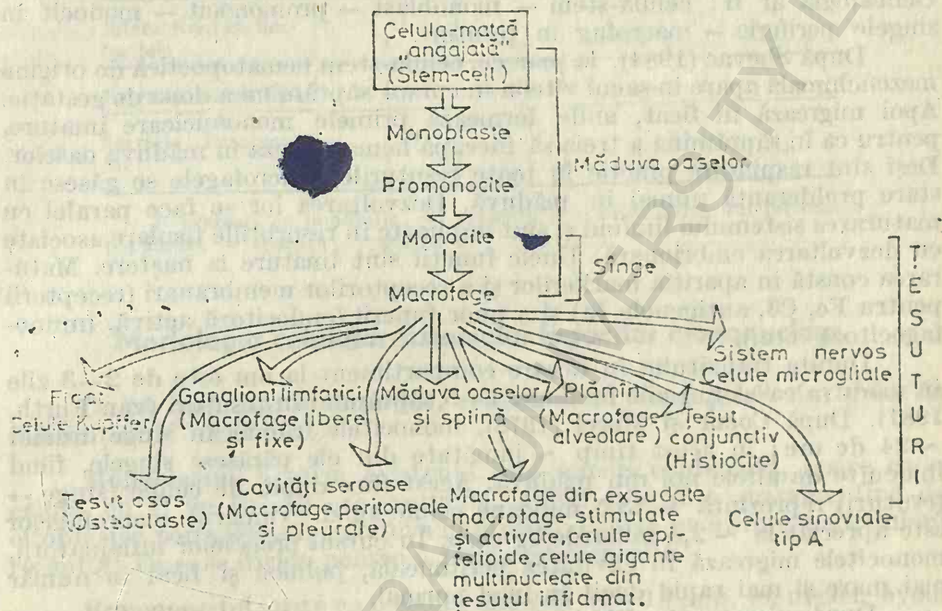


Fig. 62. — Celulele sistemului fagocitar mononuclear și răspîndirea lor în organism.

Se adaugă încă trei tipuri celulare, numite adesea *celule accesorii ale imunității*, a căror origine monocitară este încă controversată:

1) celulele Langerhans din epidermă;

2) celulele reticulare dendritice;

3) celulele interdigitate (Diebold, 1986).

Originea macrofagelor

Originea macrofagelor a fost studiată prin metode complexe, care includ studii structurale, ultrastructurale, citochimice și experiențe de marcare *in vitro* și *in vivo*, cu ajutorul timidinei tritiate (^{3}H-timidină).

La originea SFM se găsește o celulă-matcă „angajată" ("commited stem-cell"), numită și *celula formatoare de colonii* — CFC ("colony forming cell"). La rîndul său, ea provine din celula-matcă multi- sau totipotentă — *unitatea formatoare de colonii* — CFU ("colony forming unit") — care stă

la originea tuturor elementelor celulare hematopoetice, respectiv a liniei limfoide (limfocitele B, T etc.) și a liniei mieloide (macrofag, polimorfonucleare, hematii, megakariocite, mastocite). Injectarea ^{3}H-timidinei în circulația sanguină este urmată de o fixare maximă a markerului radioactiv de către celulele din măduva oaselor, cu 24 de ore mai înainte de fixarea maximă în monocitele circulante. Cum mononuclearele din măduva oaselor se divid rapid *in vitro*, s-a ajuns la concluzia că monocitele din măduvă și sînge derivă din progenitori medulari, de tipul promonocitului. Genealogia ar fi : celula-stem → monoblast → promonocit → monocit în sîngele periferic → macrofag în țesuturi.

După Shevac (1984), la șoarece, celula-stem hematopoetică de origine mezenchimală apare în sacul vitelin în cursul săptămînii a doua de gestație. Apoi migrează în ficat, unde formează primele mononucleare imature, pentru ca în săptămîna a treia să înceapă hematopoeza în măduva oaselor. Deși sînt răspîndite practic în toate țesuturile, macrofagele se găsesc în stare proliferantă numai în măduvă. Dezvoltarea lor se face paralel cu maturarea sistemului limfoid și sînt implicate în resorbțiile tisulare asociate cu dezvoltarea embrionară. Unele funcții sînt imature la naștere. Maturarea constă în apariția markerilor și a receptorilor membranari (receptorii pentru Fc, C3, antigenele Ia) și a unor funcții (endocitoză activă, imunofagocitoză etc.).

Durata tranzitului în fiecare compartiment la om este de 2—3 zile în măduva oaselor, 4 zile în sînge, 1—5 săptămîni în țesuturi (van Furth, 1981). După Coeur și Morel (1973), monocitele rămîn în sînge numai ~24 de ore ; în acest timp ~ jumătate din ele părăsesc sîngele, fiind înlocuite de altele noi din măduvă. Acest flux dublu de celule (sînge → țesuturi) reprezintă ~13,5 milioane celule/kg/zi. Numărul macrofagelor este apreciat la ~2,5 miliarde/kg corp. În cursul proceselor inflamatorii, monocitele migrează în cavitatea peritoneală, pulmon și ficat în număr mai mare și mai rapid decît în mod normal.

După migrarea în diferite țesuturi ele se diferențiază în macrofage. Procesul a fost studiat *in vitro* de Neumann și Sorg (1980), care au arătat că diferitele caracteristici funcționale apar secvențial, unele mai precoce, altele tardiv. Exprimarea fenotipică a cronologiei acestor funcții, în cursul diferențierii, explică heterogenitatea funcțională a populațiilor celulare de macrofag (Neveu, 1986) (tabelul nr. 24).

Tabelul nr. 24

Modificările caracteristicilor funcționale ale fagocitelor mononucleare în cursul maturării lor (după Werb, 1984)

Proprietatea	Promonocit	Monocit	Macrofag imatur	Macrofag matur
Proliferare	++++	+++	++	—
Granulații azurofile (mieloperoxidază pozitive)	+++	++	±	—
Lizozomi	+	++	++++	++++

Tabelul nr. 24 (continuare)

Proprietatea	Promonocit	Monocit	Macrofag imatur	Macrofag matur
Aderență de sticlă	+	++	+++	+++
Fagocitoză	±	+	+++	++++
Receptori Fc	+	++	+++	+++
Interacțiuni cu limfocitele	?	++	++++	++++
Esterază nespecifică	+++	+++	+++	+++
Secreția lizozimului	?	++	++	++

+ prezență în populație; ± prezență la o mică parte din întreaga populație; — absență; ? nesigur.

Morfologia celulelor sistemului fagocitar mononuclear

După majoritatea autorilor, celulele-stem „angajate" sînt greu de diferențiat și identificat.

Monoblastul, a cărui existență este uneori contestată, apare ca o celulă cu Ø de 10—12 μm, rotundă, avînd numai o margine fină de citoplasmă perinucleară, cu cîteva granulații. Poartă pe membrana celulară receptori Fc și se divide pentru a forma promonocite.

Promonocitul apare ca o celulă mare (Ø 12—18 μm), cu nucleu ovoid sau neregulat și 2—5 nucleoli. Granulațiile azurofile din citoplasmă conțin esteraze nespecifice, fosfataze acide, arilsulfatază și, la om, peroxidază (Lasser, 1983). La microscopul electronic se evidențiază în citoplasmă un reticul endoplasmatic dezvoltat, lizosomi primari și secundari, numeroși polisomi. Promonocitul are o activitate mitotică intensă, fapt reflectat și în capacitatea sa de a fixa masiv ^{3}H-timidina. Deși datele cantitative sînt aproximative, după Diebold (1986), promonocitele reprezintă ~ 15—20% din celulele SFM și numai 3% din celulele prezente în măduva oaselor. La omul adult, ele reprezintă ~ 600 × 10^{6} celule/kg corp.

Monocitele formează ~ 75—80% din celulele sistemului fagocitar mononuclear din măduvă. Ele sînt cele mai mari celule din sînge (Ø 12—15 μm) și reprezintă 3—8% din leucocite. Sînt celule cu formă neregulată, cu limite citoplasmatice nete, cu numeroase granulații azurofile, cîteva vacuole, un nucleu mare central, ovoid, uniform sau ± ondulat. În jurul nucleului există un număr mare de microtubuli și microfilamente, filamente de actină, proteine care leagă actina și miozina, a căror prezență este corelată cu mișcările active ale celulei, prin emiterea de expansiuni fine, ca niște voaluri ale membranei celulare. Rămîn relativ puțin timp în măduvă, trecînd în sînge după ~ 2 zile (Werb, 1984). În cursul proceselor

inflamatorii se formează în număr mult mai mare, prin amplificarea rezervei de promonocite, scăderea duratei ciclului celular şi eliberarea mai rapidă în circulaţie. Monocitele rămîn în sînge la om, între 12 şi 32 de ore (rar 70 de ore), după care trec în ţesuturi. După Drutz şi Mills (1984), la om ar exista un turnover zilnic de $\sim 7 \times 10^6$ monocite/kg corp/oră, dar, spre deosebire de leucocitele polimorfonucleare, monocitele care părăsesc circulaţia nu mor, ci se diferenţiază, evoluînd spre stadiul de macrofag tisular. Trecerea în ţesuturi este total aleatorie şi necorelată cu vîrsta lor. În cursul proceselor inflamatorii atît migrarea lor, cît şi diferenţierea la macrofag se fac mai repede decît în fazele de echilibru. Tabelul nr. 25 sintetizează principalele date referitoare la cinetica fagocitelor mononucleare.

Tabelul nr. 25

Cinetica fagocitelor mononucleare (după Werb, 1984)

Celula	Proprietatea	Om	Şoarece
Monoblast	Mărimea rezervei	?*	$2,5 \times 10^5$
	Durata ciclului celular	?	12 ore
Promonocit	Mărimea rezervei	6×10^8/kg	5×10^5/kg
	Durata ciclului celular	?	16 ore
	% din celulele medulare nucleate	2,9%	0,25%
Monocit	Mărimea rezervei în măduvă	?	$2,5 \times 10^6$
	Viteza de producere (normală)	7×10^6/kg/oră	$0,6 \times 10^5$/kg/oră
	Viteza de producere în cursul inflamaţiei	28×10^6/kg/oră	1×10^5/kg/oră
	Durata localizării în măduvă	19—60 ore	2 ore
	Mărimea rezervei în sînge	$2,7 \times 10^5$/ml	1×10^6/ml
	Timpul de înjumătăţire în sînge	8—71 ore	22 ore
	Numărul celulelor marginate în capilare	De 3—4 ori mai mare decît cel din sînge	
Macrofage din:	Distribuţia în stare normală din sînge exprimată în % din monocitele în stare de echilibru		
Ficat		?	56
Alveole pulmonare		?	15
Peritoneu		?	8
Alte tipuri		?	21
	Durata perioadei de turnover	?	8—60 zile

* Date incomplete sau absente.

Macrofagele tisulare, mature funcțional, sînt celule foarte mari (Ø 15–20 μm), avînd un nucleu relativ mic, înconjurat de o citoplasmă bogată, care conține un complex Golgi bine dezvoltat și un sistem vacuolar extensiv, alcătuit din endosomi, fagosomi, lizosomi și fagolizosomi. Macrofagele prezintă o mare heterogenitate structurală și funcțională datorită faptului că mărirea dimensiunilor, a numărului mitocondriilor și lizosomilor, ca și intensificarea activității biochimice sînt variabile după natura țesutului în care se găsesc și după starea gazdei (normală, infectată sau stimulată prin mecanisme neinfecțioase). Aceste modificări sînt, totodată, o expresie a funcțiilor complexe ale macrofagelor, care implică interacțiuni cu diferite molecule cu care vin în contact, degradarea materialelor străine, sinteza și secreția a > 75 produși diferiți etc.

Aceste particularități demonstrează că macrofagele nu formează o entitate omogenă, ci o populație de celule heterogene, care, în plus, prezintă diferențe funcționale în raport cu diferitele localizări anatomice (alveolare, peritoneale sau splenice). Este posibil ca unele diferențe ultrastructurale și funcționale să fie rezultatul influențelor locale. Macrofagele alveolare, spre exemplu, sînt expuse permanent unui mediu relativ aerob, în comparație cu cele peritoneale (relativ anaerobe). S-a demonstrat că cultivarea lor *in vitro*, în condiții hipoxice, determină modificări adaptative, morfologice, de metabolism, ca și în activitatea receptorilor membranari (Butterlick și colab., 1981). Tabelul nr. 26 prezintă sintetic caracteristicile morfofuncționale ale macrofagelor libere și fixe și a două din tipurile celulare, care preced apariția lor.

Tabelul nr. 26

Caracterele fagocitelor mononucleare normale (după van Furth, 1975)

Caracterul	Promonocite din măduva oaselor	Monocite din sînge	Țesuturi: Macrofage libere	Țesuturi: Macrofage fixe
Diametrul celulei	14–20 μm	10–14 μm	10–25 μm	10–25 μm
Raportul nucleu/citoplasmă	≥1	~1	<1	<1
Forma nucleului	Cutată sau dantelată	Reniformă	Reniformă sau ovală	Reniformă sau ovală
Nucleoli	+	+	+	+
Sinteza de ADN	50–70%	0–1%	0,5–3%	1,5–2,5%
Poliribosomi	+++	+	±	±
Reticul endoplasmatic	+	+	++	++

Tabelul nr. 26 (continuare)

Caracterul	Promonocite din măduva oaselor	Monocite din sînge	Ţesuturi	
			Macrofage libere	Macrofage fixe
Complex Golgi	Mare	Cel mai mic	Variabil	Variabil
Mitocondrii	++	++	++/+++	++/+++
Lizosomi	+	+	++/++++	++/++++
Vacuole intracelulare	+	+	++/++++	++/++++
Membrana festonată	++	+++	++++	
Microvilozităţi membranare	+	++	+++	+++
Aderenţă de sticlă	+++	+++	+++/++++	
Pinocitoză	+	++	+++	+++
Imunofagocitoză	++	+++	++++	++++

Van Furth (1978) include în sistemul fagocitar mononuclear şi unele celule caracteristice focarelor inflamatorii, ca de exemplu: 1) celulele gigante formate fie prin fuziunea macrofagelor, fie prin incapacitate de citokineză în cursul mitozei şi 2) celulele epitelioide, avînd, după unii autori, rol fagocitar şi digestiv scăzut. Prezenţa unui reticul endoplasmatic foarte dezvoltat sugerează posibilitatea unor funcţii secretoare. După alţi cercetători, ele ar fi implicate în fagocitoza materialelor greu degradabile, fapt explicat şi de prezenţa lor în inflamaţiile granulomatoase, în special cele de tip tuberculoid.

Proprietăţile suprafeţei celulare a macrofagelor

Macrofagele, ca şi polimorfonuclearele poartă pe suprafaţă ~ 30 de tipuri diferite de receptori şi o serie de antigene caracteristice (Sharma, 1986), cu rol în răspunsul imun, în fagocitoză şi în alte activităţi fiziologice. Anatomia lor moleculară este puţin cunoscută, nefiind încă sigur dacă sînt molecule unice, grupuri de molecule sau domenii ale suprafeţei celulare. Datele asupra receptorilor celulari rezultă din studiile referitoare la legarea şi/sau ingestia liganzilor sau a particulelor acoperite de liganzi de către celulele vii.

1) **Receptorii Fc** care leagă specific segmentul Fc al Ig aparţin la mai multe categorii:

a) *Receptorii Fc sensibili la proteinaze* (tripsină, chemotripsină, pronază) leagă selectiv, la om, subclasele de IgG1 şi IgG3 monomere, cunoscute sub denumirea de anticorpi citofili (Boyden şi Sorkin, 1961),

pentru că au mare afinitate pentru receptorii Fc, în absența antigenului. Ordinea afinității de legare este: IgG1 > IgG3 > IgG4 > IgG2. IgG2 și IgG4 au proprietăți citofile foarte slabe. Ele sînt ușor eluate de pe suprafața receptorilor de alte Ig monomere. Activitatea citofilă a IgG este produsă de subclase diferite la diferite specii de animale. La cobai, activitatea citofilă este legată de IgG2, iar la șoarece de IgG2a.

b) Receptorii *Fc rezistenți la proteinaze* mediază legarea eficientă a agregatelor de IgG sau a complexelor IgG — antigene și fagocitarea lor (Arend și Mannik, 1975). Numărul lor, la șoarece, este apreciat la $\sim 5-8 \times 10^5$/macrofag. La om leagă în special IgG2 și IgG4. Spre deosebire de receptorii sensibili la tripsină, receptorii rezistenți leagă grupuri de trei sau mai multe molecule de IgG, care sînt greu de eluat și sînt rapid îndepărtate din circulație *in vivo* sau fagocitate *in vitro*.

Pe baza datelor experimentale s-a ajuns la concluzia că IgA monomere sînt liganzi foarte slabi pentru receptorul Fc, care mediază îndepărtarea imună și fagocitoza. În schimb, interacțiunea anticorpilor cu antigenul induce o modificare conformațională sau în aranjamentul domeniilor Fc, care stimulează ingestia complexului. După Silverstein și colab. (1977), gruparea domeniilor Fc, rezultată din legarea IgG de antigenele multivalente, dirijează fixarea lor de receptorii rezistenți la tripsină care stimulează fagocitoza. În acest proces, anticorpii citofili și receptorii lor sensibili la proteinaze doar ajută macrofagul în legarea antigenelor și a particulelor străine. După ce o particulă acoperită cu anticorpi citofili se leagă de suprafața macrofagului, anticorpii se pot grupa, se disociază de receptorul sensibil la tripsină și apoi se reasociază cu receptorul rezistent, care stimulează fagocitoza. În ultimii ani au mai fost descriși, la diferite specii, receptori Fc care leagă exclusiv IgG3 (la șoarece), IgG2a, IgG1 și IgG2b (la șobolan). Nu se știe dacă ei sînt prezenți și la alte specii. De asemenea, pe macrofagele alveolare au fost evidențiați receptori pentru IgA, care ar putea fi implicați în mecanismele de apărare ale suprafețelor mucoase (Fanger și colab., 1980; Neveu, 1986).

Numărul și activitatea receptorilor Fc pot fi modificate de inflamații și unele stări de boală, care le pot mări chiar de patru ori. În cursul fagocitozei mediată de ei, receptorii Fc dispar din membrană și reapar treptat după 6—24 de ore.

2) **Receptorii de complement** sînt evidențiați prin imunofluorescență sau prin rozetarea hematiilor sensibilizate cu IgM și complement (Neveu, 1986). Au fost evidențiate cel puțin trei tipuri de receptori la om, șoarece și cobai, pentru *C3b*, *C3d* și *C5a*. Funcția lor variază cu starea fiziologică a macrofagelor. În condiții bazale funcționează numai pentru a lega particulele acoperite cu C3b de suprafața celulară, în timp ce în celulele „activate", receptorul C3b mediază, în asociere cu limfokinele, legarea și ingestia particulelor prin fagocitoză. Deși cele două tipuri de receptori Fc și C3b funcționează independent, *in vivo* pot acționa sinergic.

Mantovani (1975) a demonstrat că particulele acoperite simultan cu cantități suboptimale de IgG și C3b sînt ingerate cu aviditate de fagocitele „profesioniste", în timp ce particulele acoperite cu aceeași cantitate dintr-un singur ligand nu sînt fagocitate (efectul "bonus", engl.

„bonus" = beneficiu suplimentar într-o afacere, profit, divident; Roitt, 1976). Faptul este confirmat şi de Ehlenberger şi Nussenzweig (1977), care au arătat că ingestia unei hematii de către un macrofag necesită ~150 molecule de IgG, în prezenţa C3b şi ~6 000, în absenţa lui. La polimorfonuclearele neutrofile, valorile corespunzătoare sînt de 10 ori mai mari.

3) **Receptorii de limfokine** sînt implicaţi în activarea macrofagului şi în legarea factorului stimulator al coloniilor, care reglează proliferarea macrofagelor.

4) **Receptorii fagocitari nespecifici.** Sub această denumire, Silverstein, Steinman şi Cohn (1979) au descris anumite regiuni delimitate ale suprafeţei celulare, care mediază ingestia particulelor de latex sau zimozan şi a coacervatelor de ADN — proteină. Greu de delimitat şi de caracterizat, aceşti receptori se găsesc pe suprafaţa tuturor fagocitelor („profesioniste" şi „neprofesioniste"). Grupul receptorilor neimunitari este completat de un număr mare de alţi receptori identificaţi, probabil încă foarte departe de cel real.

5) **Receptorii de fibronectine.** Fibronectinele, glicoproteine cu g.m. mare, prezente în formă solubilă în plasmă şi în alte lichide biologice şi sub formă insolubilă în celule, au funcţia de opsonine nespecifice. Ele se leagă de bacterii, protozoare, glicoproteine virale, iniţiind interacţiuni complexe, care favorizează eliminarea acestora din organism (Ouaissi şi Capron, 1985). Descrişi de Richards şi Saba (1983), receptorii de fibronectine favorizează adeziunea macrofagelor de resturile celulare sau de microagregate de fibrină, determinînd eliminarea lor din organism. Ei favorizează, de asemenea, adeziunea monocitelor de regiunile lezate ale endoteliului capilar.

6) **Receptorii pentru glicoproteine** joacă un rol esenţial în recunoaşterea şi endocitoza celulelor senescente, a eritrocitelor heterologe, a celulelor de levuri şi altor fungi microscopici şi, în general, a particulelor cu glicoproteine de suprafaţă (Weir, 1980).

Macrofagele poartă, de asemenea, receptori pentru insulină, pentru complexele α-2-macroglobulină-proteinaze (cu rol important în eliminarea *in vivo* a unor enzime ca trombina, plasmina, kalikreina şi a componenţilor activaţi ai complementului), pentru complexele fibrină/fibrinogen (cu rol în îndepărtarea fibrinei din circulaţie sau din regiunile inflamatorii), pentru lipoproteinele normale şi alterate (cu rol în reglarea metabolismului colesterolului şi al trigliceridelor) etc.

Capacitatea de endocitoză

Macrofagele au drept caracter definitoriu capacitatea de a internaliza, foarte activ, diferite substanţe solubile şi particule de dimensiuni variabile. Fagocitoza, proces de importanţă fundamentală în reacţiile de apărare a organismului, nu este decît un caz particular al fenomenului de endocitoză. Aceasta corespunde unei funcţii celulare larg răspîndite

în natură, care reglează înglobarea de molecule exogene din mediu, pe calea unor vezicule sau vacuole derivate din membrana celulară. Ea este implicată nu numai în reacţiile de apărare şi imunitate, ci şi în procese mai generale ca transportul macromoleculelor, reglarea căilor metabolice şi în nutriţie (Silverstein şi colab., 1977). Legarea particulelor de membrana plasmatică este o precondiţie a internalizării. Ea determină o perturbare localizată a membranei, sub situsul de legare, care implică o remodelare a acesteia şi agregarea filamentelor de proteine contractile asociate cu o vălurire a membranei sau cu formarea de pseudopode (în cazul polimorfonuclearelor), care acoperă circumferenţial particula şi o „închid" în celulă. Prin acest mecanism, macrofagele interiorizează ~186% (iar fibroblastele ~54%) din suprafaţa normală a membranei lor celulare, în interval de o oră, sub formă de vezicule pinocitare, fără ca să apară modificări ale regiunii de suprafaţă sau ale volumului celular. Aceasta demonstrează existenţa unui proces continuu de recirculare extensivă a membranei celulare, prin care membrana internalizată ar fi readusă înapoi la suprafaţa celulei.

În funcţie de natura materialului internalizat, procesul de endocitoză poate implica fie ingestia prin pinocitoză (gr. „pinein"= a bea), fie prin fagocitoză (gr. „fagein" = a mînca). După Silverstein şi colab. (1977), **pinocitoza** corespunde înglobării veziculare de lichide şi substanţe cu g.m. mică, de macromolecule solubile (enzime, hormoni, anticorpi, toxine) şi chiar de particule foarte mici (feritină, lipoproteine, coloizi, complexe imune etc.). Prin definiţie, interiorizarea se face prin vezicule care includ lichid extracelular. Într-o abordare mai riguroasă, Werb (1984) consideră că macrofagele pot face două tipuri de pinocitoză :

1) *Micropinocitoza* corespunde ingestiei de substanţe dizolvate din mediul extracelular, prin vezicule cu Ø de 0,2 μm, mediată de legarea liganzilor solubili de receptori specifici. Procesul este independent de sinteza proteinelor. Veziculele pot avea un contur neted sau acoperit de un înveliş „acicular" format din molecule fibrilare de clatrină, proteină cu g.m. ~180 000 dal, implicată probabil în transport (Pearse 1981). Procesul pare să fie constitutiv.

2) *Macropinocitoza* este un proces care se produce intermitent, implicînd participarea unor vezicule cu Ø de 1 — 2 μm. Poate fi amorsată de receptori specifici, dar necesită sinteză de proteine. Este stimulată de o concentraţie mare de ser, ca şi de prezenţa mucopolizaharidelor şi a complexelor imune solubile.

Fagocitoza

Fagocitoza corespunde procesului de înglobare a particulelor mari şi implică apoziţia riguroasă a particulelor de membrana celulară, cu excluderea integrală sau a celei mai mari părţi din lichidul înconjurător. Este de două feluri :

1) *Fagocitoza imună*, mediată de receptorii Fc şi/sau de complement în vezicule cu Ø> 0,4 μm ;

2) *Fagocitoza neimună*, mediată de alţi receptori specifici sau nespecifici, în vacuole cu Ø> 0,4 μm. Legarea particulelor are loc şi la 4°C, dar ingestia este condiţionată de temperaturi > 18 — 21°C.

Procesul de fagocitoză realizat de macrofage evoluează în mai multe etape succesive.

Chemotaxie şi opsonizare

În cursul proceselor inflamatorii şi al infecţiilor, fagocitele sînt atrase de o serie de stimuli generaţi de o mare diversitate de agenţi (de exemplu, celulele bacteriene şi diferite produse ale lor, complexele antigen — anticorp, chemotaxinele de tipul unor componenţi ai sistemului complement (C3a, C5a), oligopeptidele N-formilate, produşii eliberaţi de limfocitele T sensibilizate, limfokine etc. (fig. 63). Migrarea dirijată şi mişcările mai vii ale macrofagelor sînt determinate de structurile subcelulare de tipul microtubulilor şi microfilamentelor (Goren, 1977).

Opsonizarea este condiţionată, în principal, de prezenţa pe macrofage a receptorilor celulari cu afinitate mare pentru IgG şi pentru C3. Bacteriile mai pot fi „capturate" şi de anticorpii deja fixaţi pe situsurile receptoare ale macrofagelor (anticorpii citofili), dar rolul opsonizării convenţionale este precumpănitor (Roitt, 1976).

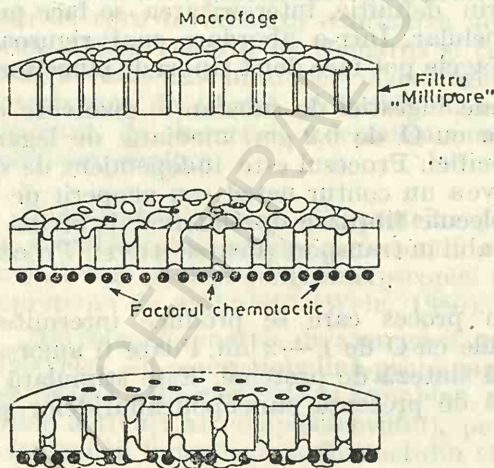


Fig. 63. — Evidenţierea factorilor chemotactici într-o cameră Boyden, prin urmărirea migrării macrofagelor printr-un filtru, spre compartimentul inferior care conţine supernatantul unei suspensii de limfocite cultivate în prezenţa antigenului specific (după David, 1973).

Faza de aderare a particulelor

Legarea diferitelor particule de macrofage este favorizată de mecanisme diferite. Mecanismul cel mai eficient şi cel mai frecvent întîlnit, în cursul proceselor infecţioase, este adeziunea mediată de interacţiunea dintre receptorii specifici Fc de Ig şi de C3 cu particula opsonizată. Procesul de opsonizare este similar celui descris la leucocitele neutrofile. În recunoaşterea şi legarea nespecifică, mecanismele şi structurile „adezive" variază după natura particulei legate (Benoliel şi colab., 1980). În cazul

legării bacteriilor sau a altor celule, un rol important revine capacității glicoproteinelor din membrana macrofagelor de a lega constituenții glucidici de pe suprafața acestora (Weir, 1980).

Un rol semnificativ revine fibronectinelor, care, pe lîngă funcția lor generală, de mărire a aderenței celulelor de substraturi și de opsoninele nespecifice, intensifică fagocitoza particulelor deja opsonizate prin legarea de Ig sau a C3. Mosher (1980) a arătat că fibronectinele se leagă de unele bacterii patogene (stafilococ, streptococ) prin intermediul unui fragment lung de 37 kdal, situat în regiunea lor NH_2-terminală, favorizînd fagocitoza. Capacitatea lor de a lega diverse particule, resturi celulare, microagregate de fibrină, glicoproteine virale, membrane celulare ale diferiților paraziți, precum și corelația constantă dintre concentrația lor plasmatică și eliminarea diferitelor particule din circulație arată rolul lor favorizant în legarea și îndepărtarea acestora de către macrofage (Ouaissi și Capron, 1985).

Ingestia

Reprezintă procesul prin care, după recunoaștere și legarea unei particule străine, macrofagul formează o serie de prelungiri ale membranei celulare, care o acoperă, înconjurînd-o, pentru a forma o veziculă fagocitară. Procesul este favorizat de prezența pe suprafața macrofagului a unui număr mare de receptori, imunitari și neimunitari, care interacționează independent sau cooperant cu liganzii de pe suprafața particulei străine, în procesele de recunoaștere și de înglobare. Bacteriile opsonizate de IgM sau IgG și complement sînt fagocitate după interacțiunea cu receptorii Fc sau C3b ai macrofagului, care, *in vitro*, funcționează independent, dar *in vivo* acționează probabil sinergic (endocitoza mediată de receptori; Griffin, 1980). Legarea unei particule de fagocitul care poartă receptori pentru liganzii de pe suprafața ei nu determină în mod obligatoriu ingestia. Spre deosebire de faza de legare (adeziune) de fagocit, ingestia este foarte dependentă de temperatură și de consumul de energie metabolică. Vray și colab. (1981) au arătat că în timp ce fagocitoza unor microbile de fier are loc mai puțin eficient pe toată suprafața celulei, bacteriile opsonizate sînt adsorbite pe un număr limitat de receptori și internalizate într-o regiune localizată a membranei macrofagului. Importanța acestui proces a fost demonstrată de numeroase experiențe, care au arătat că înglobarea particulelor străine este rezultatul unui răspuns local al unei regiuni din suprafața celulară, la semnale generate de interacțiuni specifice ale particulei cu membrana celulară (Griffin și Silberstein, 1974, 1976). Dovada o constituie faptul că asocierea unei particule ingerabile cu alta neingerabilă, ca marker, chiar foarte apropiate între ele pe membrana macrofagului, nu favorizează înglobarea particulei neingerabile. Griffin (1976) a arătat că ingestia particulelor opsonizate cu IgG sau C3b are loc prin interacțiune secvențială și circumferențială a celor două tipuri de molecule (IgG și C3b), distribuite uniform pe suprafața particulelor, cu receptorii lor de pe suprafața macrofagului (fig. 64).

Procesul de ingestie este condiționat de interacțiunea secvențială continuă între receptorii membranari ai fagocitului și liganzii de pe suprafața bacteriilor pentru producerea repetată de semnale de inducere a fago-

citozei. El este determinat de faptul că interacţiunea iniţială între receptorii membranari şi liganzii imunitari nu amorsează ingestia, ci un proces înalt organizat, care implică apoziţia continuă de receptori şi liganzi şi interacţiunea lor progresivă, pînă cînd particula este complet închisă într-o vacuolă fagocitară. Griffin (1976) a dat acestui proces numele de

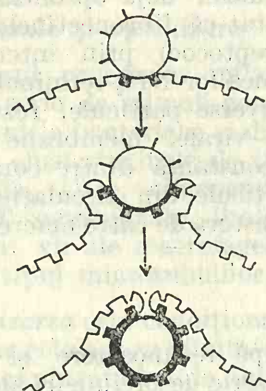


Fig. 64. — Formarea fagosomului într-un macrofag care interacţionează cu o hematie acoperită cu IgG, pe calea receptorului Fc de pe membrana plasmatică a macrofagului (după Hood şi colab. 1984).

„mecanism de fermoar" („zippering mechanism") (fig. 64). El a arătat, de asemenea, că factorul critic în determinarea sau absenţa ingestiei este distribuţia liganzilor şi a receptorilor. Dacă liganzii nu au o densitate suficientă pentru recunoaştere sau dacă receptorii nu sînt suficient de mobili, în faza fluidă a membranei celulare, procesul se opreşte în etapa de legare a particulelor pe suprafaţa macrofagului. Ingestia ulterioară, eventuală, este influenţată de creşterea numărului unităţilor specifice de legare. „Mecanismul de fermoar" explică natura discriminatorie şi segmentală a răspunsului celular la un stimul fagocitar, dar nu şi mecanismul prin care fagocitul acoperă particula şi nici nevoia de energie.

După Kaplan (1977), fagocitoza mediată de receptorul Fc implică participarea microfilamentelor din celulă (mai puţin importante în endocitoza mediată de receptorul C3b). Nevoia de ATP ar fi legată de consumul de energie, condiţionat de interacţiunea şi deplasarea în celulă a elementelor contractile citoplasmatice, precum şi de agregarea lor localizată într-o regiune a citoplasmei, situată direct sub particula care va fi fagocitată. Rezultă deci că, din acest punct de vedere, ca şi din comportarea membranei plasmatice, celula răspunde segmentar.

Griffin şi colab. (1976) propun următorul model de producere a fagocitozei imune mediată de liganzi (fig. 65):

a) Interacţiunea dintre liganzii de pe suprafaţa celulei străine cu receptorii de pe fagocit determină apariţia unui semnal, reprezentat probabil de eliberarea proteinelor de legare a actinei din membrană. Acestea iniţiază agregarea proteinelor contractile şi determină extensia pseudopodelor în regiunea în care este legată particula străină.

b) Extinderea pseudopodelor determină producerea, în continuare, de interacţiuni între receptori şi liganzi, iar acestea determină agregarea proteinelor contractile.

c) Procesul se poate repeta de mai multe ori pînă cînd membranele plasmatice se întîlnesc şi fuzionează, formînd o vacuolă fagocitară.

Modelul nu explică modul în care contracţia actomiozinei poate produce formarea pseudopodelor. După Stossel şi Hartwig (1976) este probabil că filamentele de actină, legate transversal de proteina de legare

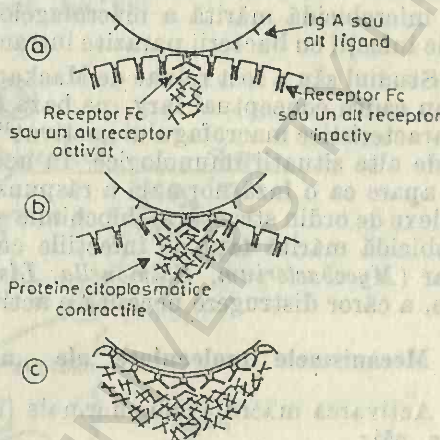


Fig. 65. — Mecanismul fagocitozei. Reprezentare schematică a rearanjării proteinelor contractile citoplasmatice, consecutivă activării receptorilor celulari (după Griffin şi colab., 1976).

a actinei şi orientate la întîmplare, ar putea fi strînse laolaltă, în fascicule, de miozina macrofagului. Cînd aceste filamente se leagă de membrana plasmatică pot determina, prin contracţia lor, formarea de pseudopode sau de voaluri membranare.

Modificările membranei macrofagelor în cursul fagocitozei

Studiile de microscopie electronică arată că în tot timpul procesului de înglobare, membrana celulară a macrofagelor este strîns aplicată pe suprafaţa particulei. Pe măsură ce ingestia progresează, membrana formează un manşon continuu, care se adaptează total la forma particulei. Procesul implică o remodelare a membranei celulare, printr-un mecanism încă necunoscut, pentru a se adapta conturului particulei. S-a presupus că vacuola fagocitară ar fi rezultatul unei fuziuni extensive a voalurilor membranare ale macrofagelor sau ale pseudopodelor în cazul leucocitelor neutrofile. Silverstein şi colab. (1977) consideră că remodelarea membranară nu este dată de fuziune, ci de o „scurgere" şi rearanjare a constituenţilor în planul membranei. Evenimentul final al înglobării este închiderea vacuolei fagocitare, care necesită obligatoriu fuziune membranară. Microscopia cu baleiaj („scanning") arată că, frecvent, ultima conexiune a vacuolei fagocitare cu spaţiul exterior este reprezentată de o mică deschidere circulară sau canaliculară, situată în centrul manşonului membranar, care acoperă particula. Închiderea ei necesită numai un punct de fuziune membranară foarte limitat.

„Activarea" macrofagelor

Fenomenul de „activare" a macrofagelor a fost observat, probabil, prima dată de Metchnikoff (1892). El a arătat că fagocitele mononucleare provenite de la animale rezistente la anumite infecții bacteriene aveau o capacitate mărită de a ingera și omorî bacteriile respective. Ca urmare, noțiunea de activare a macrofagelor se referea, inițial, exclusiv la activitatea microbicidă mărită a macrofagelor provenite de la animale imune față de infecții cu bacterii parazite intracelular (Cohn, 1978; Shevac, 1984).

Studiul său a fost reluat de Mackaness (1969, 1975), care l-a încadrat într-un cadru conceptual larg, pe baza faptului că multe dintre modificările caracteristice macrofagului „activat" pot fi induse nu numai de infecții, ci și de alte situații imunologice. În acest context, „activarea" macrofagelor apare ca o fază normală a răspunsului imun, asociată cu modificări complexe de ordin structural, biochimic și biologic, corelate cu o activitate microbicidă mărită față de infecțiile cu virusuri, bacterii parazite intracelular (*Mycobacterium*, *Salmonella*, *Listeria*, *Brucella*) și alte microorganisme, a căror distrugere necesită o activitate citocidă ridicată.

Mecanismele moleculare ale „activării" macrofagelor

Activarea macrofagelor normale (în repaus) se poate realiza pe mai multe căi:

1) Calea cea mai importantă este, pe lîngă cea de interacțiune directă cu microorganismele și antigenele străine, „activarea" consecutivă unor interacțiuni complexe cu limfocitele T stimulate de antigene sau de produșii lor. Se declanșează un întreg ciclu al antigenului după schema: antigen → macrofag → limfocit T → macrofag → antigen (Shevac, 1984), la capătul căruia acesta este eliminat din organism. În acest proces, deci, macrofagul are o funcție dublă: a) efectuează „prelucrarea" și „prezentarea" antigenelor, asigurînd recrutarea și stimularea limfocitelor T și b) își exercită funcțiile sale esențiale de distrugere și de îndepărtare a antigenelor din organism. Limfocitele T stimulate de antigen acționează asupra macrofagelor prin intermediul mediatorilor lor specifici, limfokinele.

În acest proces au fost incriminați trei factori, a căror identitate este controversată, și anume: *factorul inhibitor al migrării macrofagelor* (MIF), *factorul activator al macrofagelor* (MAF) („Macrophage activating factor") și *interferonul* γ („Macrophage inhibitor factor"). Intervenția acestor factori a fost dovedită de faptul că macrofagele din exsudatul peritoneal de la șoarece, cultivate *in vitro*, în monostrat, pot fi activate prin adăugarea de limfocite sensibilizate față de un antigen specific sau de supernatantul culturilor de limfocite provenite de la un animal cu rezistență mare la tuberculoză.

2) Meltzer și colab. (1982) au propus un model de „activare" a macrofagelor valabil atît pentru celulele bacteriene, cît și pentru cele tumorale. Procesul ar decurge în trei faze succesive:

a) Recrutarea monocitelor imature din sînge și diferențierea lor în celule capabile să reacționeze la prezența limfokinelor;

b) Celulele astfel modificate interacționează cu limfokinele pentru a deveni „instruite" (pregătite, informate, puse în stare de funcționare) (engl. „primed");

c) Macrofagele „instruite" lipsite de activitate citotoxică sînt amorsate de acțiunea unor semnale secundare (cantități foarte mici de lipopolizaharide bacteriene sau cantități mari de limfokine) și convertite la starea de macrofag complet activat (fig. 66).

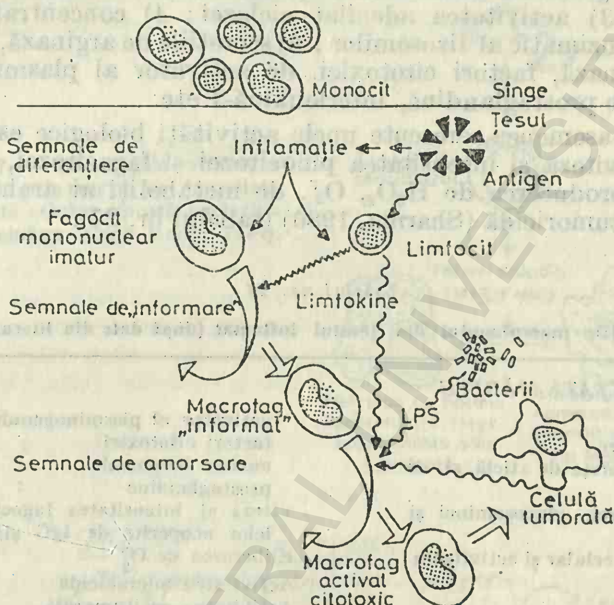


Fig. 66. — Etapele implicate în dezvoltarea macrofagelor activate (după Meltzer, modificată de Sharma, 1986).

3) Activarea prin intermediul substanțelor chimice a fost demonstrată cu ajutorul unei game largi de substanțe ca lipopolizaharidele sau derivatele lipidice din bacterii, endotoxine, filtrate de cultură de bacterii parazite intracelular (*Listeria* etc.), glicani, lectine vegetale etc.

4) Activarea prin interacțiune cu produșii de activare ai sistemului complement, ai reacțiilor de coagulare și, probabil, cu interferonii.

5) Activarea prin stimulare specifică cu anticorpi, respectiv prin legarea anticorpilor citofili de receptorul Fc al macrofagului.

Proprietățile macrofagului „activat". Macrofagul „activat" este încă relativ puțin cunoscut, deoarece exprimarea funcțională a activării *in vivo* pare să fie un fenomen foarte complex. El diferă de macrofagul martor, normal, provenit de la animale neinfectate, printr-o serie de proprietăți morfologice, biochimice și funcționale: 1) are dimensiuni mai

mari ; 2) este mai mobil și, în consecință, are capacitatea de a se răspîndi mai repede pe sticlă și pe materialul plastic ; 3) emite voaluri membranare mai proeminente. Unele activități sînt diminuate ca, de exemplu, nivelul ecto-5'-nucleotidazei prezente pe suprafața celulei, producția de leucotrienă C, de apolipoproteină E, de enzimă de clivare a NAD^+ și de formare a receptorilor pentru transferină etc. În general însă, în macrofagul activat, cele mai multe activități sînt intensificate.

Între activitățile crescute, cele mai semnificative sînt următoarele : 1) transportul glucozei, glucozaminei și leucinei ; 2) oxidarea glucozei la compuși C1 ; 3) activitatea adenilat ciclazei ; 4) concentrația cGMP ; 5) conținutul enzimatic al lizosomilor ; 6) secrețiile de arginază, proteinaze neutre, colagenază, factori citotoxici, de activator al plasminogenului ; 7) eliberarea de prostaglandină, interleukină-1 etc.

Sînt, de asemenea, crescute unele activități biologice esențiale, ca, de exemplu : viteza și intensitatea pinocitozei și fagocitozei, activitatea microbicidă (producerea de H_2O_2, O_2^-, de metaboliți ai arahidonatului) și activitatea tumoricidă (Sharma, 1986) (tabelul nr. 27).

Tabelul nr. 27

Proprietățile macrofagului din țesutul inflamat (după date din literatură)

PROPRIETĂȚI MĂRITE	activator al plasminogenului
Dimensiunea	factori citotoxici
Viteza de deplasare	enzime lizosomale
Aderența de suprafețe de sticlă și de plastic	prostaglandine
Transportul glucozei, glucozaminei și leucinei	Viteza și intensitatea fagocitozei particulelor acoperite de IgG și/sau C3
Concentrația ATP celular și activitatea adenilat ciclazei	Eliberarea de O_2^-
Consumul de O_2	Activitatea microbicidă
Consumul de glucoză	Activitatea antitumorală (citostatică citotoxică)
Concentrația fosfodiesterazei alcaline	*ACTIVITĂȚI DIMINUATE*
Secreția de :	Producerea de leucotrienă C
arginază	Sinteza de 5'-nucleotidază
colagenază	Secreția de apolipoproteină E
elastază	

Spre deosebire de activitatea limfocitelor T și B, activarea macrofagului este nespecifică, fapt care explică de ce un macrofag „activat", spre exemplu, de *Mycobacterium tuberculosis* poate fi activ și față de alte bacterii patogene intra-, dar și extracelulare (fig. 67). Acest fenomen, pe lîngă înrudirea dintre *M. tuberculosis* și *M. leprae*, ar putea explica eficiența relativă a vaccinului BCG în prevenirea leprei. De regulă însă, eliminarea microorganismului omolog, care a declanșat activarea, este mai promptă și mai eficientă. El ar sta, de asemenea, la baza stimulării nespecifice a sistemului imun cu *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium parvum* (*Propionibacterium acnes*), endotoxine, produși din *Mycobacterium*, în vederea creșterii activității antitumorale a macrofagelor. Figura 68 sintetizează diferitele căi de activare a macrofagelor normale (nestimulate).

Macrofagele animalelor tratate cu stimuli inflamatori nespecifici, diferiţi de microorganisme ca origine, prezintă unele modificări similare celor caracteristice macrofagului ,,activat" (enzimatice, lizosomale, metabolice, fagocitare etc.), dar nu identice. Între altele, nu au activităţi microbicide şi nici antitumorale crescute. Ele nu sînt ,,activate", ci ,,stimulate" ,,Elicited") (Macrofage ,,inflamatorii").

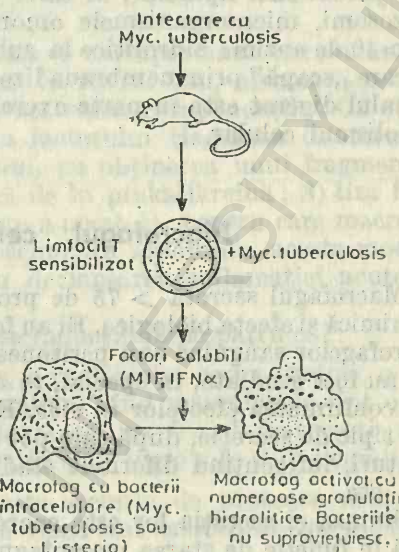


Fig. 67. — Macrofagele stimulate specific prin reacţii de imunitate mediată celular omoară bacteriile intracelulare (după Roitt, 1974).

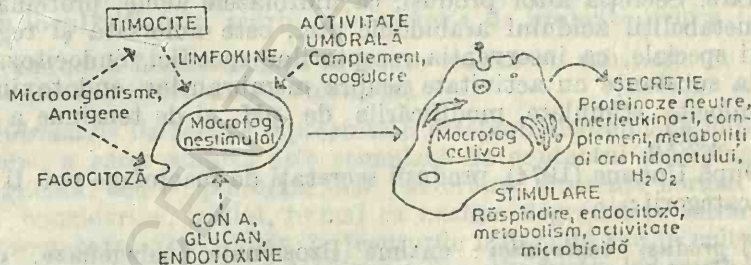


Fig. 68. — Reprezentare schematică a procesului de activare a unui macrofag nestimulat. Activarea poate fi produsă prin interacţiune directă cu microorganismele sau cu antigenele, prin interacţiune cu limfocitele T activate, cu produşii activării complementului şi ai sistemelor de coagulare sau cu anumiţi compuşi chimici (Con A, glucan etc.) (după Werb, 1984).

Omorîrea şi distrugerea microorganismelor fagocitate

Procesul de înglobare este urmat de o intensificare explozivă (,,burst") a metabolismului, cu creşterea consumului de O_2 şi glucoză, a shunt-ului hexozomonofosfaţilor, a ciclului glutation reductază—glutation oxidază etc. După pătrunderea în macrofag, particulele înglobate în fagosomi

sînt dirijate și propulsate de intervenția microtubulilor și a microfilamentelor pentru a se ciocni și fuziona cu lizosomii, producînd fagolizosomi. Cele mai multe microorganisme fagocitate mor în cîteva minute și în ~2 ore, majoritatea sînt expuse degradării.

Mecanismul omorîrii lor este necunoscut. Este probabil că un rol esențial îl are acțiunea H_2O_2 și a radicalilor superoxid O_2^-, hidroxil $OH^\bullet$ și oxigen singlet $^1O_2$. În cazul macrofagelor alveolare, un rol important revine peroxidării lipidelor, ai cărei cataboliți sînt intens bactericizi. În fagolizosomi, microorganismele omorîte sînt degradate prin intervenția celor >40 de enzime hidrolitice la subunități de ~200 dal, sau chiar mai mici, care „scapă" prin membrana lizosomală în citoplasmă. În continuare, materialul digerat este în parte excretat, iar restul, folosit ca substrat în metabolismul celular.

Macrofagul, celulă secretoare

Macrofagul secretă > 75 de produși, cu mare diversitate de structură chimică și efecte biologice. Ei au fost identificați în lichidele de cultură a macrofagelor sanguine sau peritoneale. Funcțiile lor, efectoare și reglatoare, au fost studiate, în special, *in vitro* și necesită încă, pentru cei mai mulți, confirmarea efectelor *in vivo*. Eliberarea lor se realizează printr-un proces tipic de secreție, după care pot modula activitatea diferitelor celule și țesuturi, influențînd diferitele stadii ale proceselor inflamatorii, fagocitoza etc.

Sinteza și secreția lor este coordonată printr-un proces complex și variază în funcție de starea macrofagului. Astfel, unii compuși (lizozimul, compușii complementului) sînt sintetizați constitutiv în toate stadiile de dezvoltare. Secreția altor produși, ca hidrolazele acide, proteinazele neutre, metaboliții acidului arahidonic etc., este amorsată și reglată de condiții speciale, ca intervenția receptorilor specifici, endocitoza, expunerea la substanțe cu activitate asupra membranelor, endotoxine, ionofori, limfocite stimulate, modificările de pH și de tensiune a O_2 etc. (Werb, 1984).

După Unanue (1974), produșii secretați de macrofage pot fi grupați în trei categorii:

1) *produși enzimatici*: enzime lizosomale, colagenaze, elastaze, activatorul plasminogenului etc., care afectează proteinele extracelulare;

2) *produși implicați în reacțiile de apărare ale gazdei*: lizozim, interferon, compuși ai complementului, agenți microbicizi etc.;

3) *produși care modulează activitatea celulelor înconjurătoare*: monokine, factori limfostimulatori, factori stimulatori ai producerii de colonii, diferiți inhibitori etc.

Secreția de enzime. Activarea macrofagelor prin limfokine sau prin fagocitoza bacteriilor, a complexelor imune etc. este însoțită de eliberarea a numeroase enzime active, intra- sau extracelulare. Proteazele neutre

(colagenaza, elastaza, angiotensinconvertaza, activatorul plasminogenului etc.) acționează în funcție de natura lor.

Colagenaza atacă pereții vasculari, țesutul perivascular, suprafețele articulare etc. Produșii de degradare ai colagenului sînt chemotactici pentru monocite și macrofage, și, probabil, stimulează acumularea acestora.

Elastaza macrofagelor atacă, în special, fibrilele de elastină nativă prezente în diferite structuri.

Activatorul plasminogenului este o serinprotează care transformă plasminogenul la plasmină. Aceasta, la rîndul său, afectează cel puțin trei „cascade" enzimatice prin : 1) activarea componenților C1 și C3 ai sistemului complement ; 2) clivarea factorului Hageman (factorul XII) al sistemului de coagulare a sîngelui, cu obținerea unui fragment care stimulează producerea de kalikreină de la prekalikreină ; 3) liza fibrinei și apariția unor produși de degradare a acesteia, pentru care macrofagele au receptori cu funcții încă necunoscute. În ansamblu, aceste modificări măresc implicarea macrofagului în declanșarea inflamației acute și în coagulare.

Secreția proteazelor neutre este inductibilă pe patru căi :

1) Sub acțiunea endotoxinelor, a proteinelor serice străine, a microorganismelor și altor particule ingerabile. Cînd macrofagele sînt obligate să le fagociteze se declanșează o adevărată „explozie" de secreție a acestora, care durează numai cît timp particulele înglobate sînt digerate.

2) Complexele imune pot crește secreția de proteaze neutre cînd sînt în stare ingerabilă și o diminuă dacă sînt imobilizate pe o suprafață care nu poate fi înglobată.

3) Mediatorii de proveniență limfocitară, limfokinele, atrag macrofagele în locul inflamat, mărindu-le secreția de proteaze neutre *in situ*.

4) Inducția farmacologică se poate realiza cu substanțe de tip inflamator (forbolesteri) sau cu colchicină.

Hidrolazele lizosomale reprezintă o categorie deosebit de importantă de enzime, a căror sinteză este stimulată de contactul macrofagelor cu peptidoglicanii sau cu polizaharidele bacteriene. Prezente normal în lizosomi și considerate, inițial, numai ca enzime degradative intracelulare, ele sînt secretate extracelular, în țesuturile inflamate sau în culturi celulare, prin exocitoza conținutului lizosomilor. Producția lor crește în cazul macrofagelor stimulate de complexele imune, de diferiți mediatori. Pe lîngă efectul direct, pe substratul lor major de acțiune, hidrolazele acide (tabelul nr. 28) degradează colagenul, membrana bazală și țesutul conjunctiv, complementul, imunoglobulinele și kininele, reglînd astfel stimulii propriei lor eliberări (Sharma, 1986).

Eliberarea lor în cursul fagocitozei are loc cînd lizosomii fuzionează cu vacuolele de endocitoză care nu s-au închis încă complet, menținînd încă o mică breșă de comunicare cu exteriorul. Eliberarea prin contact cu suprafețele acoperite de complexe antigen—anticorp se realizează prin migrarea lizosomilor la suprafața membranelor stimulate, urmată de o pinocitoză inversă. În general, se eliberează numai 10—25% din conținutul

Tabelul nr. 28

Hidrolazele lizosomale acide din macrofage (după Werb, 1984)

Enzima	Substratul major pe care activează
Fosfataze	Esteri fosforici
Aril sulfataze	Esterii acidului sulfuric
Colesteril esteraze	Esterii colesterolului din lipoproteine
Triglicerid lipază	Trigliceridele lipoproteinelor
Fosfolipaze	Fosfolipide bacteriene, lipoproteine
Glicozidaze	Glucide, glicozaminoglicani etc.
Proteinaze:	
Catepsina B	Colagen, proteoglicani
Catepsina A	Hemoglobină

total în enzime, celelalte fiind reținute pentru activitatea de digestie intracelulară. Numai excepțional, cînd se fagocitează particule mai mari, parțial insolubile, se pot elibera cantități superioare (Unanue, 1974).

Produși cu rol în apărarea gazdei

Lizozimul (muramidaza) este produs constitutiv de macrofage, independent de enzimele lizosomale, indiferent dacă sînt stimulate sau nu. Aproximativ 80% din produs este secretat în special după activarea macrofagului. Are efect bacteriolitic și stimulator al fagocitozei, iar uneori efect antineoplazic, prin acțiune directă pe membrana celulei tumorale. Concentrația lui în sînge și în urină crește în cursul infecțiilor, a leucozelor monoblastice sau mielomonocitare acute, subacute și cronice.

Proteine plasmatice. Macrofagele secretă o serie de proteine plasmatice cu funcții deosebit de importante:

1) *Fibronectina* pe care o folosesc pentru adeziunea de diferite celule și ca opsonină nespecifică. După Neveu (1986), fibronectina acționează și ca mediator în inflamație, determinînd recrutarea fibroblaștilor în țesuturile lezate unde aceștia proliferează și produc țesut de cicatrice.

2) *α-2-macroglobulina*, inhibitor al proteinazelor, capabilă să regleze capacitatea macrofagului de a liza macromoleculele din țesutul conjunctiv și de a participa în „cascadele" complementului, coagulării și kininelor

3) *Transcobalamina II*, implicată în transportul vitaminei B_{12}.

4) *Apolipoproteina E*, cu rol în transportul lipidelor și în imunoreglare.

5) *Tromboplastina tisulară* și *factorii V, VII, IX și X* implicați în coagulare, ceea ce face ca macrofagele să participe atît în coagulare, cît și în fibrinoliză etc. (Werb, 1984).

Componenții sistemului complement. Interacțiunea dintre macrofag și complement ilustrează o relație complexă, care implică participarea receptorilor și secrețiilor macrofagului, a limfocitelor și unor mediatori

umorali. Macrofagele sintetizează și secretă numeroși compuși (după unii autori chiar toți) ai căilor clasică și alternativă ale complementului. După Neveu (1986), macrofagele asigură, în special, sinteza de C1q, C2, C3, C4 C5, B, F, D și properdină. C3a favorizează liza celulelor tumorale de către macrofage, iar C3b provoacă eliberarea de hidrolaze acide lizosomale. Eliberarea de C4 și C2 este în special masivă și urmată de acumularea progresivă în mediu, cînd macrofagele înglobează bacterii.

Macrofagele leagă complementul activat prin cel puțin două tipuri de receptori de pe suprafața lor și îi degradează componenții prin acțiunea proteinazelor pe care le secretă. La rîndul său, sistemul complement, prin interacțiunea cu receptorii macrofagelor, afectează comportamentul migrator și activitatea endocitară și secretoare a acestora. În mod special, anafilatoxinele C3a și C5a stimulează migrarea macrofagelor *in vivo* și *in vitro*. Receptorii de complement leagă de macrofage particulele acoperite cu complement, acționînd sinergic cu receptorii Fc pentru IgG, pentru a stimula ingestia lor. Hematiile acoperite cu complement, în absența IgG, se leagă de macrofagele normale de șoarece, dar nu sînt fagocitate. Cînd macrofagul este activat, receptorii de complement dobîndesc atît capacitatea de a media legarea, cît și ingestia (Nathan și colab., 1980). Celulele T elibereează un mediator care produce această modificare a receptorilor de complement ai macrofagelor, iar macrofagele activate secretă un factor care stimulează celulele T să producă acest mediator.

Factorul pirogen endogen. Macrofagele reprezintă singura sursă de producere a factorului pirogen endogen, hormon de natură proteică cu acțiune complexă: 1) determină apariția febrei, ca urmare a afectării centrului de termoreglare hipotalamic; 2) mărește răspunsul celulelor T la antigene; 3) stimulează granulocitele neutrofile să elibereze lactoferină. Aceasta se leagă de receptorii macrofagelor unde pot sechestra Fe, fapt ce explică hiposideremia din cursul inflamațiilor. Factorul pirogen și lactoferina ar acționa, *in vivo*, pentru a împiedica leucocitoza excesivă în cursul inflamației.

Natura complexă și subtilă a relațiilor inițiate de secrețiile macrofagelor este ilustrată și de cazul prostaglandinelor, care scad efectul factorului stimulator al coloniilor asupra celulelor progenitoare, în timp ce factorul respectiv mărește eliberarea de prostaglandine din macrofage.

Moleculele care influențează diferențierea celulară. Sub denumirea generică de *monokine* au fost descriși o serie de mediatori de tip hormonal, care stimulează sau inhibă proliferarea și/sau funcțiile a diferite linii celulare, intervin în inflamație etc.

Principalul factor stimulator este *interleukina-1*, activă în concentrații foarte mici (10^{-10} M), denumire sub care sînt reunite în prezent monokinele, descrise inițial sub denumirile de *factor activator al limfocitelor* (FAL), *factor activator al timocitelor* (TPF), *mediatorul leucocitar endogen* (LEM) și *factorul ajutător HP-1* ("Helper-peak-1", Dinarello, 1984) (Sharma, 1986).

Interleukina-1 (IL-1) este o proteină cu g.m. ~15 000 dal, dar și cu g.m. mai mari (35 000—60 000 dal), reprezentînd probabil specia de 15 000 dal complexată cu serumalbumină sau cu alte proteine. După

Mizel şi Rosenstreich (1979); IL-1 cu g.m. mare ar fi un precursor din care s-ar forma, prin clivare, tipul 15 000 dal (Rosenstreich, 1979).

Interleukina-1 are o serie de efecte foarte importante în răspunsul imun:

1) acţionează asupra limfocitelor T imunocompetente, în special a grupului de limfocite facilitante-inductoare, care poartă antigenul $T4^{+}$;

2) stimulează proliferarea, diferenţierea, exprimarea receptorilor de antigen pe celulele T şi producerea de interleukină-2;

3) stimulează proliferarea limfocitelor B şi favorizează transformarea lor în plasmocite şi astfel producerea anticorpilor;

4) amplifică efectele reacţiilor imunitare şi inflamatorii;

5) măreşte mitogeneza timocitelor etc.

IL-1 acţionează şi pe celule nelimfocitare, stimulînd fibroblaştii, sinoviocitele şi condrocitele, favorizînd producerea şi eliberarea de colagenază şi de prostaglandine (vezi cap. „Răspunsul imun"). Tabelul nr. 29 prezintă cele mai importante categorii de substanţe biologic active secretate de macrofage.

Tabelul nr. 29

Principalii produşi de secreţie ai macrofagelor (după date din literatură)

ENZIME:	*LIPIDE BIOACTIVE*:
Lizozim	
Arginază	Prostaglandina E_2
Lipoprotein lipază	Tromboxan B_2
Angiotensin convertază	Leucotriena C
	Metaboliţii arahidonatului
PROTEAZE NEUTRE:	6-ceto-prostaglandina F1α
Activatorul plasminogenului	
Colagenazele de tip I, II şi III (specifice pentru colagenul interstiţial)	*PROTEINE PLASMATICE*:
Colagenazele de tip IV (specifice pentru colagenul membranei bazale)	Fibronectină
	Factorul I (inactivatorul C3b)
	Factorul H(1H; inactivator-accelerator al C3b)
Colagenazele de tip V (specifice pentru colagenul pericelular)	Proteine de coagulare
	Factorii V, VII, IX, X
Proteinazele citolitice	Tromboplastină celulară
Elastazele	Transcobalamina II
	Apolipoproteina E
HIDROLAZE ACIDE:	
Proteinaze	*METABOLIŢI AI NUCLEOTIDELOR*:
Peptidaze	
Glicozidaze	
RNaze	AMPc
DNaze	Timidină
Lipaze	
Fosfataze	Uracil
Sulfataze	Acid uric

(Tabelul nr. 29 continuare)

METABOLIŢI REACTIVI AI OXIGENULUI: H_2O_2 Anionul superoxid Radicalul hidroxil Oxigenul singlet (?)	*FACTORI DE REGLARE A SINTEZEI PROTEINELOR ÎN:* Hepatocite Sinoviocite
COMPONENŢI AI COMPLEMENTULUI: C1, C4, C2, C3, C5 Factorii B, F, şi D Properdină	*INHIBITORI ENZIMATICI:* Plasmină α-2-macroglobulină
FACTORI STIMULATORI AI PROLIFERĂRII PENTRU: Fibroblaşti Endotelii Celule B Celule T Precursori ai celulelor mieloide (factorul stimulator al coloniilor) Precursori ai eritrocitelor	*FACTORII INHIBITORI AI PROLIFERĂRII PENTRU:* Celule tumorale *Listeria monocytogenes* *Corynebacterium* sp. Virusuri (interferoni) Limfocite *FACTORI DE REGLARE FUNCŢIONALĂ:* Interferoni Interleukina-1 *FACTORI CHEMOTACTICI:* Neutrofile

Metaboliţii reactivi ai oxigenului. Stimulii generaţi de eliberarea unor produşi de secreţie ai macrofagelor, în special enzimatici, pot determina rapid producerea de către macrofagele activate a unor metaboliţi activi (puternic oxidanţi) ai oxigenului ca, de exemplu, H_2O_2, anionul superoxid, radicalul hidroxil şi, după unii autori, oxigenul singlet. Ei determină moartea microorganismelor agresoare şi unele leziuni celulare, prin oxidarea grupărilor tiol ale enzimelor, ruperea legăturilor chimice din structura proteinelor, a lipidelor şi a acizilor nucleici. Reacţiile în lanţ iniţiate de radicalii liberi nu afectează numai celulele şi ţesutul conjunctiv, ci şi unii mediatori inflamatorii.

Funcţia de epurare a macrofagelor. După cum remarcă Silverstein şi colab. (1977), deşi înglobarea şi distrugerea microorganismelor reprezintă expresia cea mai impresionantă a rolului endocitozei şi a macrofagelor în fiziologia organismelor multicelulare, ea este cantitativ de importanţă secundară. Funcţia dominantă, sub raport cantitativ, este cea de *înglobare şi degradare*, la subunităţile chimice de construcţie a celulelor senescente sau moarte, a unor fragmente de celule şi a particulelor mici şi macromoleculelor endocitate zilnic de macrofage. Astfel, din cele 5×10^{13} hematii prezente în organismul unui om adult de 70 kg, în fiecare zi sînt îndepărtate din circulaţie de către macrofage 1/120, respectiv $\sim 3 \times 10^{11}$ celule. Aceasta demonstrează că, într-un an, sistemul fagocitar mononuclear ingeră şi digeră $\sim 2{,}7$ kg hemoglobină. Recunoaşterea hematiilor senescente şi uzate se face datorită pierderii de acid sialic din membrana lor, probabil asociată cu intervenţia unor Ig speciale, prezente în serul normal omolog (Kay, 1975).

Macrofagele participă, de asemenea, în procesele complexe care asigură *vindecarea leziunilor inflamatorii* şi a rănilor infectate, printr-o acţiune complexă care include:

1) debridarea ţesuturilor, prin intermediul fagocitozei şi al enzimelor secretate;

2) îndepărtarea celulelor moarte şi a hematiilor uzate;

3) reglarea coagulării sîngelui; fibrinoliză;

4) reglarea neovascularizării;

5) reglarea refacerii endoteliilor şi a fibroblaştilor;

6) resorbţia ţesutului osos.

De asemenea, ele participă şi în alte procese fiziologice importante ca:

1) reglarea mărimii rezervelor de granulocite şi hematii, prin producerea factorului stimulator al coloniilor şi prin eritropoetină şi

2) în metabolismul lipidelor, prin îndepărtarea resturilor de chilomicroni, a lipoproteinelor uzate şi prin secreţia de apolipoproteină E (Werb, 1984).

Rolul macrofagului în imunitate

„În filogenie, sistemul fagocitar mononuclear a apărut mult mai înainte decît sistemul limfoid. De aceea, se poate spune că sistemul imunitar a apărut ca să ajute macrofagele şi nu invers".

E. R. UNANUE, J. CALDERON

Macrofagele au numeroase funcţii esenţiale în inducţia şi reglarea răspunsului imun, în diferitele sale manifestări ca: imunitatea mediată celular, imunitatea mediată umoral, hipersensibilitatea de tip întîrziat etc. Astfel, Mosier (1967) a arătat că macrofagele sînt necesare pentru producerea de anticorpi: după îndepărtarea macrofagelor, splenocitele încetează sinteza de Ig *in vitro*. Seeger şi Oppenheim (1972) au demonstrat că transferul macrofagelor incubate anterior *in vitro*, în contact cu un antigen, induce reacţia de hipersensibilitate întîrziată, deoarece prima etapă în inducţia acestor reacţii pare să fie interacţiunea dintre macrofage şi antigene. În sfîrşit, Ishizaka şi Adachi (1974) au descris interacţiunea dintre macrofage şi celulele T_H.

Principalele modalităţi de participare a macrofagului în imunitate sînt următoarele:

Înglobarea şi prelucrarea antigenelor

Macrofagele înglobează din mediul extracelular cantităţi importante de antigen, care sînt, în mare parte, degradate în primele 2—5 ore după înglobare. Persistenţa îndelungată a imunogenităţii este asigurată de men-

ţinerea unui procent mic de antigen în macrofag, într-o formă protejată de degradare şi eliminare (Unanue şi Askona, 1968). Antigenul conservat persistă calitativ neschimbat, dar imunogenitatea lui scade progresiv, sugerînd o pierdere a accesibilităţii la limfocitele reactive. O bună parte din antigen este localizat în asociere cu membrana plasmatică a macrofagului (vezi cap, „Răspunsul imun").

„Prezentarea" antigenului

Pe lîngă persistenţa *în* şi *pe* macrofag, acesta are un rol esenţial în prezentarea antigenelor către celulele T_H, T_C şi B şi în eliberarea unor mici cantităţi de antigen imunogen, timp îndelungat. Cea mai mare parte din antigen este eliberat sub formă macromoleculară, deşi obişnuit cu o greutate moleculară mai mică decît cea a proteinei native, care a fost înglobată. Aceasta demonstrează că după înglobare, antigenele au fost expuse unui catabolism parţial. Degradarea parţială şi prezentarea antigenelor de către macrofage este mai importantă în cazul antigenelor mari, particulate, decît în al celor solubile (vezi cap. „Răspunsul imun").

Rolul interacţiunilor dintre macrofag şi celulele T şi B în imunitate

Numeroase fapte de observaţie au demonstrat rolul important al macrofagului în imunitatea mediată celular şi/sau umoral. Morrissey şi colab. (1981) au arătat experimental că îndepărtarea macrofagelor, prin adsorbţia celulelor splenice pe un substrat poros, opreşte sinteza anticorpilor ca răspuns la antigenele timodependente. Adăugarea celulelor reţinute prin adsorbţie restabileşte procesul de anticorpogeneză. În general, se consideră că stimularea limfocitelor B de către antigenele timoindependente nu necesită prezenţa macrofagelor, dar în majoritatea experimentelor efectuate nu se exclude absenţa completă a acestora. Ceva mai mult, este posibil ca unele antigene independente, ca, de exemplu, lipopolizaharidele bacteriene să stimuleze producerea de IL-1 de către cele cîteva macrofage prezente şi aceasta, sintetizată local, să inducă răspunsul celulelor B.

Morgan şi Weigle (1980) consideră că, în cele mai multe cazuri, diferenţierea celulelor B este dependentă atît de prezenţa macrofagelor, cît şi de cea a celulelor T_H şi că activarea necesită un scurt contact între macrofagele stimulate de antigen şi celulele T. Interacţiunea macrofage — celule T este esenţială în imunitatea mediată celular, aşa cum s-a demonstrat, spre exemplu, în cazul rezistenţei la paraziţi intracelulari. În acest tip de imunitate, macrofagele favorizează producerea de limfocite T sensibilizate la antigen. Limfocitele T sensibilizate şi mediatorii specifici ai imunităţii mediate celular sînt produşi în ţesutul limfoid regional, de unde trec în sînge. În acest proces, limfocitele T sensibilizate produc limfokine, dintre care unele (MIF — „Macrophage inhibition factor") stimulează localizarea macrofagelor circulante. De asemenea, ele intensifică endocitoza şi activitatea microbicidă (fig. 69).

Interacţiunea dintre macrofage şi celulele T este importantă în imunitatea mediată celular şi pentru funcţia efectoare a macrofagelor asupra unor celule-„ţintă", în care limfocitele T îndeplinesc funcţia de elemente de recunoaştere specifică (Unanue, 1976). Pentru a interacţiona eficient,

macrofagele şi celulele T trebuie să fie „histocompatibile", respectiv să aibă antigene Ia identice. Yamashita şi Shevac (1978) au demonstrat importanţa antigenelor Ia în interacţiunea dintre macrofagele care prezintă antigenul şi celulele T_H, precum şi în cooperarea dintre celulele T_H şi B. (vezi cap. „Complexul major de histocompatibilitate" şi „Răspunsul imun").

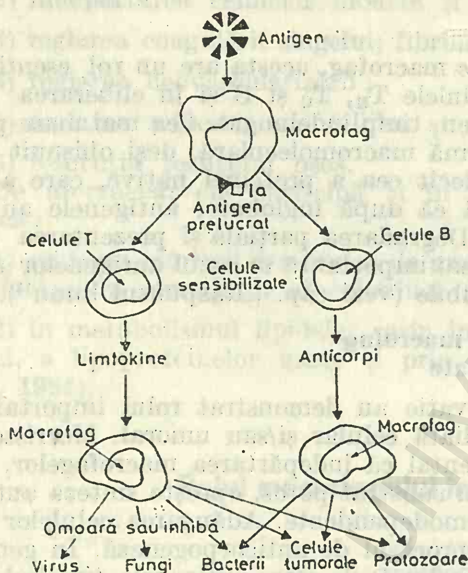


Fig. 69. — Reprezentare schematică a interacţiunii macrofagelor cu celulele T şi B în inducţia răspunsului imun, cu dezvoltarea consecutivă a macrofagelor capabile să omoare microorganismele şi celulele neoplazice (după Sharma, 1986).

Macrofagele îndeplinesc şi alte funcţii importante în reacţiile de apărare a gazdei prin :

1) Îndepărtarea şi catabolismul substanţelor străine. Această proprietate este considerată de importanţă esenţială pentru rezistenţa la agenţi patogeni, pentru că modulează fie activitatea, fie răspunsul imun.

2) Transportul eficient şi rapid al antigenelor în organism şi prezentarea lor într-o formă imunogenă amplificată.

3) Rol în imunoreglare prin eliberarea sau legarea de factori solubili, care stimulează sau supresează proliferarea şi diferenţierea limfocitelor.

4) Acţionează în cooperarea celulelor T şi B şi exercită citotoxicitate mediată celular (Roelants, 1977).

6) Producere şi secreţia unui număr mare de substanţe, care măresc sau diminuează funcţiile unei mari varietăţi de celule (Sharma, 1986).

7) Participare directă în răspunsul inflamator acut şi cronic.

8) Producere de pirogen endogen.

9) Imunofagocitoză asociată cu activităţi microbiostatice şi citostatice.

10) Sinteza şi secreţia componenţilor complementului.

Macrofagul, celulă citotoxică

Macrofagul participă la funcția de supraveghere imunitară („Imunosurveillance"), al cărui rol esențial este de a veghea la eliminarea oricărei celule mutante sau care, pe alte căi, a dobîndit caractere nonself, ce pot da naștere unei clone anormale. Omorîrea celulelor maligne se poate face pe două căi, incomplet elucidate ca mecanism (Keller, 1976; Neveu, 1986):

1) **Citotoxicitatea specifică** implică intervenția limfocitelor T și recunoașterea unor antigene specifice, înainte ca macrofagul să-și exercite acțiunea. Se produc astfel macrofage „înarmate", citotoxic specifice ("Armed macrophages") (Evans, 1973). Acest efect ar fi determinat de un factor specific, prezent în supernatantul culturilor de limfocite sensibilizate, care are afinități și se adsoarbe atît pe suprafața macrofagelor, cît și a celulelor-țintă. Procesul facilitează un contact strîns între macrofage și celulele-țintă, care duce la inhibarea creșterii și la liza celulelor tumorale. Mecanismul exact al citotoxicității specifice nu este cunoscut.

2) **Citotoxicitatea nespecifică** evoluează ca o funcție naturală, detectabilă și la animalele normale, influențate de o serie de stimuli chimici și biologici. Cele mai multe date se referă la observații efectuate pe culturi de celule sau la animale de laborator. Nu se știe în ce măsură pot fi extrapolate la om.

Mecanismele biochimice ale citotoxicității macrofagelor. După unii autori, efectele citotoxice ale macrofagelor ar fi determinate de o serie de produși sintetizați de macrofage, de tipul *factorului necrozant al tumorilor*, FNT ("Tumour necrosis factor"), proteină cu g.m. ~17 300 dal, activă pe celulele tumorale, nu însă și pe cele normale. S-ar adăuga efectul metaboliților oxigenului produși de macrofage (H_2O_2, O_2^-, $^1O_2$ și OH•), care pot liza direct sau potența efectul citotoxic. Rolul lor este încă controversat. După unele date, pretratarea celulelor tumorale cu concentrații mici de H_2O_2 (~10^6 mol/l) mărește sensibilitatea acestora față de efectul litic al factorului citotoxic murin. După Freedman și colab. (1984) însă, macrofagele activate ar putea liza celulele tumorale chiar în absența totală a O_2, metabolismul neoxidativ favorizînd acțiunea antitumorală citocidă. Fenomenele citolitice ar implica participarea unor proteinaze, a complementului (C3a) și, în plus, stimularea celulelor NK și a unei deaminaze (arginaza).

După Nathan și colab. (1980), macrofagele obținute din tumori pe cale de regresie sînt mai citotoxice pentru celulele tumorale *in vitro* decît cele provenite din tumorile care progresează. Ei citează următoarele observații în favoarea rolului antitumoral al macrofagului: 1) macrofagele infiltrează țesutul tumoral. Conținutul tumorilor în macrofage se corelează invers cu potențialul lor metastatic; 2) macrofagele stimulate farmacologic *in vitro* amorsează un răspuns citotoxic rapid, în paralel cu secreția de H_2O_2; 3) celulele tumorale acoperite cu anticorpi specifici se leagă de receptorii Fc ai macrofagelor, determinînd, după interacțiune,

un răspuns litic extracelular şi eliberarea de H_2O_2 şi anion superoxid; 4) macrofagele „recunosc" natura malignă a celulelor-„ţintă", fără intervenţia altor factori (celulele nemaligne nu furnizează un astfel de semnal şi scapă de efectul citotoxic); 5) imunoterapia intralezională determină o infiltrare masivă cu macrofage; 6) imunoterapia nespecifică (BCG, *Corynebacterium parvum*) măreşte capacitatea macrofagelor de a inhiba creşterea tumorilor *in vitro*; 7) substanţele toxice pentru macrofage grăbesc dezvoltarea tumorilor.

Datele experimentale sugerează existenţa unui număr mare de mecanisme de citotoxicitate, dar bazele lor moleculare sînt încă necunoscute.

Rolul macrofagelor în apărarea antivirală. Macrofagele participă la eliminarea celulelor infectate cu virusuri, fie direct, fie indirect, prin acţiunea interferonului produs, care stimulează citotoxicitatea celulelor T_C sau/şi NK.

Supravieţuirea şi multiplicarea microorganismelor în macrofage

Deşi înglobarea şi omorîrea microorganismelor de către macrofage reprezintă un mecanism central în apărarea organismelor animale, unele microorganisme folosesc endocitoza pentru a pătrunde în celulele-gazdă, în vederea multiplicării.

Ca şi virusurile, unele microorganisme pătrund cu ajutorul unor molecule-receptoare specifice de pe suprafaţa celulei. Miller şi colab. (1974) au demonstrat că posibilitatea infectării exclusive a celulelor umane cu *Poliovirus* este dată de prezenţa unor receptori specifici de pe suprafaţa celulară, absenţi la alte tipuri de celule. În mod similar, prezenţa antigenelor Duffy pe suprafaţa hematiilor umane este esenţială pentru infectarea lor cu merozoizii de *Plasmodium*, după cum existenţa unui component de suprafaţă, sensibil la proteaze, mediază legarea şi internalizarea tripomastigoţilor de *Trypanosoma cruzei* în macrofagele de şoarece. Existenţa pe suprafaţa celulelor a unor receptori care reprezintă un dezavantaj important pentru gazdă s-ar putea explica prin faptul că au un rol fiziologic încă nedecelat: virusurile şi protozoarele s-ar substitui compusului normal, „mimînd" unele din proprietăţile acestuia sau adaptînd aceşti receptori nevoilor lor.

Microorganismele patogene au dezvoltat mai multe mecanisme prin care ocolesc efectele fagocitozei, fuziunea fagosomilor cu lizosomii şi acţiunea enzimelor lizosomale. Datorită acestora, numeroşi paraziţi intracelulari, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Salmonella*, *Legionella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella*, *Pasteurella*, *Histoplasma*, *Candida guillermondii*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Plasmodium* etc., se pot multiplica în macrofage. Unele bacterii, ca, de exemplu, *Mycobacterium leprae murium*, pot fi evidenţiate în vacuole identificate ca fagolizosomi, fiind deci adaptate să trăiască într-un mediu recunoscut ca ostil. Ele datorează această proprietate prezenţei unui material capsular peptidoglicolipidic — micozidul C — relativ inert chimic, care asi-

gură protecţia pasivă a celulei bacteriene (Draper şi Rees, 1970). Avînd o structură fibrilară, acesta este însă permeabil pentru moleculele mici de nutrienţi (Goren, 1977). *Mycobacterium tuberculosis*, parazit facultativ intracelular, interferă cu fuziunea fagosomilor cu lizosomii graţie prezenţei unui glicolipid de suprafaţă cu trehaloză, evitînd astfel distrugerea de enzimele lizosomale.

Hart şi colab. (1972) au studiat acest fenomen utilizînd feritina, marker electronoopac, utilizat curent pentru a cuantifica fuziunea fagolizosomală, deoarece se acumulează în lizosomii secundari. Ei au demonstrat că după infecţia cu tulpina virulentă de *M. tuberculosis — H 37 Rv*, fuziunea fagolizosomală apare numai cînd vacuolele fagocitare conţin bacterii provenite din inoculum-ul originar lezate fizic şi numai foarte rar cînd fagosomii conţin bacterii intacte şi potenţial viabile. În schimb, dacă se inoculează bacterii virulente intacte, dar inactivate prin iradiere cu ^{60}Co, fuziunea fagolizosomală este extrem de răspîndită. Fenomenul demonstrează că fuziunea este dependentă de recunoaşterea stării organismelor intrafagosomale. *M. leprae* rezistă, de asemenea, la acţiunea conţinutului fagolizosomal şi trece în citoplasma macrofagelor, unde nu este recunoscut ca străin, probabil datorită peretelui celular rezistent la hidroliză.

O comportare relativ asemănătoare au microorganismele care se multiplică în fagosomi. Astfel, celulele vii de *Chlamydia* şi *Toxoplasma* pătrund în macrofage cu ajutorul vacuolelor endocitare, împiedicînd fuziunea lor cu lizosomii şi rămîn astfel protejate de distrugere. În schimb, celulele inactivate sînt degradate în lizosomi. Această comportare demonstrează că, probabil, capacitatea de a inhiba fuziunea fagosom — lizosom necesită producerea continuă a unor metaboliţi sau a unor produşi de sinteză. După Nathan şi colab. (1980), posibilitatea macrofagelor murine de a inhiba multiplicarea sau de a omorî protozoarele *Toxoplasma gondii* sau *Trypanosoma cruzi* depinde strict de starea de activare a macrofagelor şi este perfect corelată cu capacitatea lor oxidativă, apreciată pe baza eliberării de H_2O_2. Macrofagele care omoară *T. gondii* eliberează de 35 de ori mai multă H_2O_2 decît cele care îi permit multiplicarea. Reducerea experimentală a concentraţiei H_2O_2, a anionului superoxid sau a radicalului hidroxil în macrofagele activate interferă cu activitatea antitoxoplasmică.

Sistemul fagocitar polimorfonuclear

(Pl. 8–12)

Granulocitele neutrofile sînt celule terminale, prezente la toate animalele cu sistem circulator, implicate, în principal, în distrugerea microorganismelor patogene extracelulare. Datorită structurii lor şi, în special, nucleului segmentat sînt considerate ca fiind îndeosebi apte să străbată spaţiile înguste, ca, de exemplu, cele dintre endoteliile capilarelor, pentru a migra în ţesuturile inflamate. Nu este clară necesitatea prezenţei a două sisteme de celule fagocitare, cu proprietăţi care se suprapun parţial. În general, se consideră că sistemul fagocitar mononuclear are, în mare măsură, unele activităţi complementare, controlînd, în special, microorganismele capabile de supravieţuire intracelulară, faţă de care polimorfonuclearele sînt ineficiente. Macrofagele ar servi în plus ca un sistem de sprijin pentru neutrofile în infecţiile bacteriene acute, deşi fagocitează mai slab şi nu au atîtea sisteme bactericide ca neutrofilele. Activitatea lor bactericidă poate fi însă mărită de limfocitele sensibilizate, fie prin contact direct, intercelular, fie prin intervenţia mediatorilor specifici.

Se apreciază că la omul adult ar exista $\sim 12{,}1 \times 10^9$ granulocite neutrofile repartizate astfel: $0{,}7 \times 10^9$ în sînge, dintre care $0{,}3 \times 10^9$ circulante şi $0{,}4 \times 10^9$ marginate în capilarele sanguine. Cea mai mare cantitate $\sim 11{,}4 \times 10^9$ celule s-ar găsi în măduva oaselor, unde $\sim 2{,}6 \times 10^9$ ar forma un stoc cu capacitate mitotică, iar $\sim 8{,}8 \times 10^9$ ar forma stocul de rezervă propriu-zis (fig. 70).

Originea, evoluţia şi diferenţierea neutrofilelor

Neutrofilele îşi au originea într-o celulă-stem (celulă-matcă) pluripotenţială din măduva oaselor. Importanţa lor este reflectată şi de faptul că $\sim 3/4$ din celulele nucleate din măduvă determină producerea de leucocite polimorfonucleare (Bainton, 1980). În cazul neutrofilelor au fost evidenţiate în măduva oaselor următoarele stadii de evoluţie, în care multiplicarea diferitelor celule este corelată cu maturarea lor funcţională şi cu modificări structurale asociate: celule-stem → celule progenitoare angajate → mieloblaste → promielocite → mielocite → metamielocite → polinucleare nesegmentate → polinucleare segmentate mature (fig. 71).

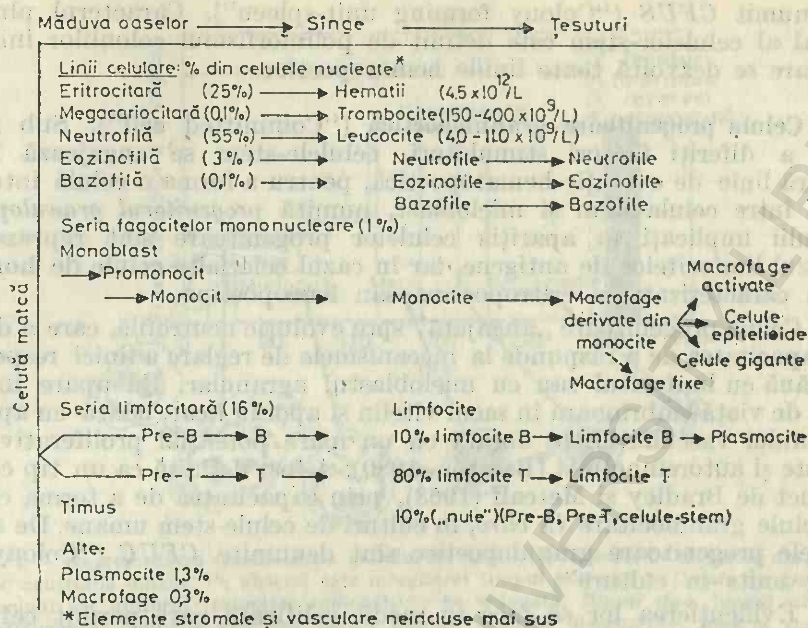


Fig. 70. — Repartizarea leucocitelor în diferite compartimente ale organismului uman. Figura prezintă unele date cantitative exprimate în procente sau număr/l (după Bainton, 1980).

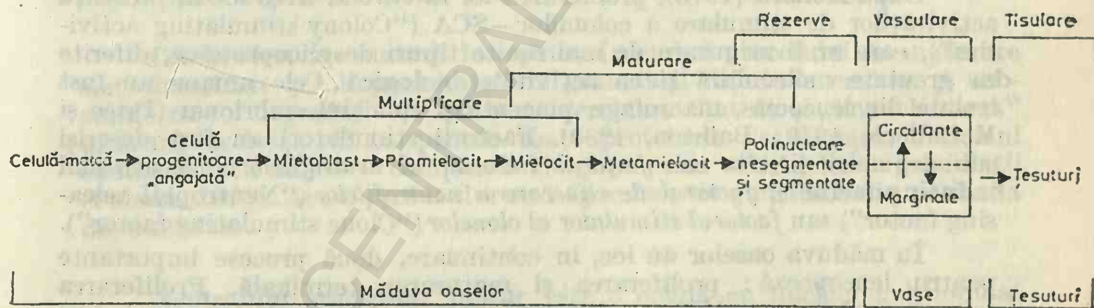


Fig. 71. — Reprezentare schematică a fazelor de dezvoltare a leucocitelor polimorfonucleare cu menționarea situsurilor în care au loc.

Celula-matcă pluripotentă are capacitate de proliferare și de autoreînnoire pentru a servi ca bază celulară pentru menținerea clonei hematopoetice, care va produce liniile multiple celulare din sînge (eritrocitară, limfocitară, leucocitară, trombocitară) (fig. 70).

Existența ei poate fi demonstrată prin *tehnica coloniilor splenice* (Till și McCulloch, 1961), care evidențiază capacitatea celulelor-stem de a induce formarea de colonii celulare splenice, la șoarecii cu aplazii ale splinei, consecutive iradierii cu doze letale. De aceea, acest tip de celulă

este numit *CFUS* ("Colony forming unit-spleen"). Caracterul pluripotenţial al celulelor-stem este definit de polimorfismul coloniilor iniţiate, din care se dezvoltă toate liniile hematopoetice.

Celula progenitoare granulopoetică ("Committed cell"). Sub influenţa a diferiţi factori stimulatori, celulele-stem se angajează într-o singură linie de evoluţie hematopoetică, pentru a forma o celulă intermediară între celula-stem şi mieloblast, numită *progenitorul granulopoetic.* Stimulii implicaţi în apariţia celulelor progenitoare sînt reprezentaţi în cazul limfocitelor de antigene, iar în cazul celorlalte celule de hormoni puţin caracterizaţi ca eritropoetina sau leucopoetina.

Celula progenitoare „angajată" spre evoluţie neutrofilă, care a dobîndit capacitatea de a răspunde la mecanismele de reglare a liniei respective seamănă cu limfocitul sau cu mieloblastul agranular. Ea apare în ziua a 7-a de viaţă embrionară în sacul vitelin şi apoi în ficat, odată cu apariţia sistemului vascular. Este dotată cu un mare potenţial proliferativ, dar nu este şi autoreînnoibilă (Bainton, 1980). A fost definită ca un tip celular distinct de Bradley şi Metcalf (1968), prin capacitatea de a forma colonii de celule granulocitare *in vitro,* în culturi de celule-stem umane. De aceea, celulele progenitoare granulopoetice sînt denumite *CFUC* ("Colony forming units in culture").

Evidenţierea lor se face în medii gelificate, care permit celulelor unice să rămînă localizate şi să genereze prin multiplicare, după 7 — 25 de zile, fie agregate ("Clusters") de 3 — 50 de celule, fie colonii (> 50 de celule). În medie, coloniile au 80 — 300 de celule (cu limite între 50 şi 10 000, în funcţie de durata incubării şi de tipul de stimulent utilizat).

După Hollard (1975), proliferarea lor *in vitro* ar avea loc în prezenţa activităţilor de stimulare a coloniilor—SCA ("Colony stimulating activities"), care ar fi asigurate de mai multe tipuri de glicoproteine, diferite ca greutate moleculară şi ca activitate biologică. Cele umane au fost izolate din leucocite, macrofage, placentă şi rinichiul embrionar (Price şi McCulloch, 1970; Bainton, 1980). Factorii stimulatori au fost descrişi sub denumiri diferite ca: *factorul inductor al neutrofilelor* ("Neutrophil inducing factor"), *factorul de eliberare a neutrofilelor* ("Neutrophil releasing factor") sau *factorul stimulator al clonelor* ("Clone stimulating factor").

În măduva oaselor au loc, în continuare, două procese importante pentru leucopoeză: proliferarea şi maturarea terminală. Proliferarea se realizează în cursul a ~ 5 diviziuni, care au loc numai în primele trei stadii de diferenţiere (mieloblast, promielocit şi mielocit).

Mieloblastul este o celulă relativ nediferenţiată, cu un nucleu mare, oval, nucleoli mari şi citoplasmă lipsită de granulaţii. El se formează din rezerva de celule precursoare (celulele progenitoare angajate).

Promielocitul corespunde stadiului în care apar granulaţiile fine azurofile, mai mari, iar **mielocitul**, celui de formare a granulaţiilor fine specifice (fig. 72). După stadiul de mielocit, celulele devenite terminale ("end cells") sînt incapabile de mitoză, intrînd în depozitul de rezervă al măduvei oaselor.

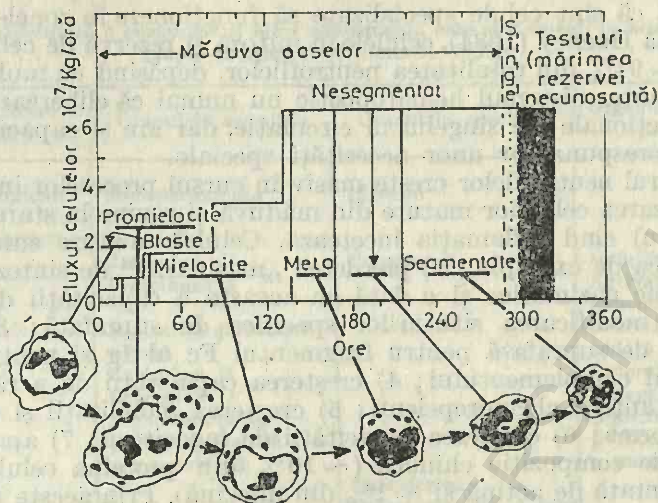


Fig. 72. — Reprezentarea schematică a ciclului de viaţă şi a stadiilor de maturare ale granulocitelor neutrofile umane. Pe abscisă este inregistrat timpul petrecut în fiecare compartiment, determinat cu ajutorul izotopilor radioactivi; pe ordonată, fluxul de-a lungul diferitelor compartimente. Numărul celulelor creşte treptat, datorită diviziunilor, pînă la stadiul de metamielocit, de la care mitozele încetează. Suprafaţa compartimentelor în care nu au loc diviziuni celulare este proporţională cu numărul celulelor (după Bainton, 1980).

Metamielocitul şi **granulocitul nesegmentat** corespund unor stadii neproliferante şi nesecretorii, care evoluează spre stadiul matur.

Celula efectoare matură în repaus. În cursul procesului de maturare sînt sintetizate şi „împachetate" în granulaţii diferitele enzime şi substanţe cu rol degradativ şi/ sau antimicrobian. Sinteza şi „împachetarea" urmează aceleaşi căi ca pentru toate proteinele de secreţie: reticulul endoplasmatic rugos → complexul Golgi pe calea veziculelor → granulaţii (Palade, 1975). Acest proces durează aproximativ jumătate din perioada de maturare.

Neutrofilul segmentat matur este o celulă cu nucleu multilobulat şi cu o citoplasmă care conţine ambele tipuri de granulaţii (azurofile şi specifice) şi glicogen. Neutrofilele mature trec în sînge unde circulă ~10 ore, după care se reîntorc în ţesuturi, unde mai trăiesc ~2—4 zile. Ritmul de reînnoire a neutrofilelor circulante este de ~65 ± 10⁷/kg corp/zi (Dresch, 1975).

Spre deosebire de eritropoeză, granulopoeza suferă variaţii de intensitate, foarte mari şi rapide, necesare pentru a răspunde numeroaselor solicitări de neutrofile circulante. Celulele produse sînt repartizate în cele trei compartimente: rezerva medulară, neutrofilele marginate şi cele circulante. Deşi numărul celor depozitate în măduva oaselor este greu de estimat, se consideră că neutrofilele din sîngele periferic reprezintă numai o mică proporţie, ţinînd seama de durata redusă a prezenţei lor în sînge

şi de faptul că sînt celule specializate să funcţioneze în zonele extravasculare. După Haeney (1984), celulele în mitoză şi rezerva de celule mature formează ~94% din totalitatea neutrofilelor, depăşind cu mult numărul celor circulante. Sistemul hematopoetic nu numai că eliberează continuu celulele funcţionale ale sîngelui în circulaţie, dar are şi capacitatea de a răspunde corespunzător unor necesităţi speciale.

Numărul neutrofilelor creşte masiv în cursul proceselor inflamatorii, prin mobilizarea celulelor mature din măduvă şi revine la starea normală (de echilibru) cînd inflamaţia încetează. Celulele mature suferă şi alte modificări, ca de exemplu: 1) pierderea „maşinăriei" de sinteză a diferitelor proteine enzimatice şi o dată cu aceasta a capacităţii de granulogeneză; 2) modificarea situsurilor specifice de suprafaţă; 3) apariţia receptorilor de suprafaţă pentru fragmentul Fc al Ig şi pentru componentul C3 al complementului; 4) creşterea capacităţii de a răspunde la chemoatractanţi şi chemorepelenţi; 5) creşterea mobilităţii şi capacităţii de a se deforma; 6) creşterea capacităţii de fagocitoză; 7) apariţia unor modificări de compoziţie chimică (~10% din proteina celulară totală este reprezentată de actină şi ~1% din miozină). Prin aceste modificări, neutrofilele devin celule specializate, cu viaţă scurtă, cu rol important în apărarea organismelor, prin capacitatea lor de răspuns chemotactic, de mobilitate, fagocitoză şi activitate microbicidă.

La om, ~1/2 din neutrofilele circulante se deplasează pasiv în curentul central (axial) al vaselor de sînge, în timp ce restul se deplasează lent în afara acestuia, într-un compartiment marginal, pe suprafaţa endoteliului vascular. În mod normal, ele aderă numai rar şi temporar de suprafaţa endotelială. În cursul infecţiilor însă o mare parte din leucocitele circulante aderă de endoteliu (*marginaţie*), înainte de a străbate peretele capilarului (*diapedeză*), pentru a trece în ţesuturile inflamate.

Granulaţiile neutrofilelor. Polimorfonuclearele neutrofile conţin două tipuri principale de granulaţii, deosebite ca mărime, masă, formă, origine, cronologie de apariţie şi conţinut. Singurul constituent comun este lizozimul.

Granulaţiile azurofile (Bainton şi Farquhar, 1966), granulaţiile *A* (Baggiolini şi De Duve, 1969) sau *primare* (Wetzel, 1970) au o formă sferică sau elipsoidală şi un ∅ de 500 — 800 nm. Pot fi separate prin sedimentare diferenţială sau prin echilibrare izopicnică, respectiv, fie pe bază de masă, fie de densitate (Bretz şi Baggiolini, 1974). Sedimentează mai repede decît alte granulaţii, datorită mărimii lor, şi au o densitate la echilibru de $1{,}26 \cdot cm^{-3}$. Ele apar pe suprafaţa proximală, concavă, a aparatului Golgi, prin înmugurire din cisterne. Cresc prin fuziune, în timp ce matricea lor devine progresiv mai condensată, pe măsură ce se îndepărtează de zona Golgi. Conţin o serie de enzime litice care includ ~50 — 90% din setul de hidrolaze acide prezente obişnuit în lizosomi, trei proteaze cu activitate optimă la pH neutru (elastaza, catepsina G şi proteinaza 3), lizozim etc. (tabelul nr. 30). De asemenea, conţin întreaga cantitate de mieloperoxidază prezentă în celulă.

Prin conţinutul lor, granulaţiile azurofile au un rol esenţial în omorîrea bacteriilor şi în degradarea diferitelor substanţe de origine biologică.

Tabelul nr. 30

Localizarea subcelulară a enzimelor și altor constituenți, care sînt stocați în neutrofilele umane (după Baggiolini și Dewald, 1985)

Categoria de constituenți	Granulele azurofile	Granulele specifice	Organite mai mici de depozitare *
Enzime microbicide	Mieloperoxidază Lizozim	Lizozim	—
Proteinaze neutre	Elastază Catepsina G Proteinaza 3	Colagenază	Gelatinază Activatorul plasminogenului (?) **
Hidrolaze acide	N-acetil-β-glucozaminidază Catepsina B Catepsina D β-glicuronidază β-glicerofosfatază α-manozidază	—	N-acetil-β-glucozaminidază Catepsina B Catepsina D β-glicuronidază β-glicerofosfatază α-manozidază
Alte categorii		Lactoferină Proteinele de legare a vitaminei B_{12}	

* Populație heterogenă de organite, incluzind particulele C și veziculele secretoare, considerate ca purtătoare de gelatinază.

** Date încă nesigure.

Granulațiile specifice (Bainton și Farquhar, 1966), granulațiile *B* (Baggiolini și De Duve, 1969) sau *secundare* (Wetzel, 1970) sînt mai mici decît cele azurofile și au o formă variabilă, în general alungită. Sedimentează de patru ori mai lent decît granulațiile azurofile și sînt echilibrate la o densitate de $1{,}23 \cdot cm^{-3}$. Apar mai tardiv, la promielocitele mature și la mielocite în măduva oaselor, pe suprafața distală sau convexă a aparatului Golgi. În neutrofilul matur sînt de ~ două ori mai numeroase decît cele azurofile și se colorează palid (neutrofilie).

Formarea lor este mai greu de urmărit, deoarece nu conțin o enzimă detectabilă citochimic. În orice caz, este evident că atunci cînd mielocitul se divide, numărul granulațiilor azurofile scade, în timp ce cel al granulațiilor specifice continuă să crească. Conțin toată lactoferina, ~ 90% din fosfataza alcalină celulară, restul de lizozim, colagenază, proteina de legare a vitaminei B_{12} etc.

Funcția lor este greu de definit (Baggiolini și Dewald, 1985). Ele sînt mobilizate brusc în perioada de formare a fagosomului, fuzionează cu acesta și dispar din citoplasmă. Datorită tendinței de a fuziona cu fagosomii pe cale de formare, conținutul lor poate să treacă în spațiul extracelular. Granulațiile azurofile fuzionează cu fagosomii ceva mai tîrziu, iar conținutul lor are tendința de a rămîne în fagolizozom.

Neutrofilele umane conțin și o a treia populație de particule subcelulare **de depozit**, considerabil mai mici decît granulațiile, avînd o compoziție heterogenă. Ele conțin unele hidrolaze acide, incluzînd o cantitate mare de catepsină B și D, o proteinază serinică (proteinaza 3) și, în exclusivitate, o metaloproteinază, gelatinaza (Dewald și Baggiolini, 1982,

1985). Ele formează un compartiment de depozit secretor, care îşi eliberează conţinutul în mediu dacă neutrofilele normale sînt stimulate de molecule chemotactice. În general, diferitele enzime şi proteine neenzimatice produse în perioada de maturare şi incluse în granulaţii rămîn segregate în aceste structuri subcelulare, pînă cînd neutrofilul percepe un stimul chemotactic sau prezenţa unui material fagocitabil.

Deficienţe legate de absenţa granulaţiilor. Absenţa congenitală a granulaţiilor specifice determină apariţia de infecţii piogene recurente, asociate cu diminuarea adezivităţii, agregării şi chemotaxiei neutrofilelor *in vitro*. Aceste modificări ar putea fi datorate la trei cauze:

1) deficienţei în lactoferină (LF), glicoproteină care leagă fierul, constituent principal al granulaţiilor specifice (Boxer şi colab., 1982). Eliberată extracelular de către neutrofilele care fagocitează, LF ar avea un rol important în apărarea gazdei, în afara celulelor în care s-a format, mărind aderenţa acestora de endotelii, capacitatea de agregare şi chemotaxia;

2) incapacităţii celulelor de a-şi reface receptorii de factori chemotactici, care ar fi derivaţi din membrana granulaţiilor specifice (Gallin şi Seligmann, 1984);

3) lipsei granulaţiilor specifice ce ar determina o diminuare a glicoproteinei *Mol* α, care, ca şi receptorii de factori chemotactici, ar fi localizată în granulaţiile specifice. În cursul degranulării ea ar fi translocată în membrana plasmatică a neutrofilului unde îşi exercită acţiunea (Todd şi colab., 1984; Forehand şi Johnston, 1985).

Polimorfonuclearele eozinofile sînt celule cu granulaţii de tip special, care apar pe microelectronografii cu o regiune centrală electronoopacă (cristaloid), înconjurată de o matrice mai puţin densă (Houba şi colab., 1976). Granulaţiile lor conţin un spectru larg de enzime (fosfataze acide, ribonucleaze, catepsină, peroxidază, sulfataze, arilsulfataze, β-glicuronidaze etc.).

Eozinofilele, prezente în număr mic în sîngele circulant ($< 0{,}55 \times \times 10^9/l$) (Tai şi Spry, 1976), prezintă mişcări amoeboide, migrează prin chemotaxie, fagocitează şi suferă degranulare. Activitatea lor microbicidă este mai slabă decît a neutrofilelor (De Chatelet, 1978). Fagocitează eficient complexele antigen—anticorp, în special dacă conţin IgE (Shikawa şi colab., 1974). Creşterea numărului lor peste limitele normale (eozinofilia) poate fi determinată de producerea crescută în măduvă, de recircularea accelerată din rezervele medulare, de supravieţuirea prelungită a eozinofilelor circulante sau de anumite categorii de antigene şi mediatori.

Biomecanica neutrofilelor

Una din proprietăţile cele mai evidente ale neutrofilelor este mobilitatea, care le permite să se deplaseze activ în ţesutul interstiţial perivascular, pe endoteliul vaselor sanguine sau pe diferite suporturi (sticlă).

Într-un mediu neutru din punct de vedere chimic, ele au tendința să-și modifice direcția de deplasare la fiecare ~20 μm, emițînd pseudopode cu orientare aleatorie, astfel încît celula „merge" în zigzag. În condiții ideale, viteza de deplasare a polimorfonuclearelor este de 36 — 40 μm/minut, în timp ce monocitele și macrofagele se mișcă mult mai încet.

În ultimele decenii au fost efectuate numeroase studii asupra mecanismelor mișcării amoeboide. Ele au fost elaborate fie direct, pe leucocite polimorfonucleare, fie pe microorganisme monocelulare de tipul protozoarelor și extrapolate la neutrofile.

Bazele moleculare ale mișcării amoeboide. Concepția clasică (McCutcheon, 1946) atribuia mișcarea amoeboidă a neutrofilelor transformării reversibile sol ⇌ gel a citoplasmei. Extremitatea „anterioară" a leucocitelor ar fi, în special, în stare de sol și s-ar putea transforma în gel la suprafață, pe măsură ce celula înaintează.

Ulterior, o pondere tot mai mare au căpătat ipotezele care considerau contractilitatea ca factor determinant al „scurgerii" citoplasmei, al formării și extinderii pseudopodelor și al mișcării celulare. După *teoria contracției „cozii"* (Allen, 1955), acceptată o lungă perioadă de timp, se admite că forța care determină „scurgerea" citoplasmei în pseudopod este generată de o contracție apărută în „coada" celulei (sau uroid). Citoplasma s-ar deplasa „la vale", într-un gradient de presiune, către o regiune de suprafață „slăbită", spre extremitatea pseudopodului. Teoria nu poate fi conciliată cu unele date experimentale, care au arătat că sucțiunea aplicată citoplasmei în uroid nu produce schimbarea sensului de scurgere a citoplasmei în pseudopod.

Modelul contracției frontale (Allen, 1951) postulează că evenimentele contractile se produc la extremitatea oricărui pseudopod care înaintează. Modelul a fost propus inițial pentru a explica observația că citoplasma izolată poate „curge" în absența organizării normale pseudopodale, în același mod și cu aceeași geometrie observată în celulele intacte.

Un progres deosebit au adus studiile de microscopie electronică și cele referitoare la ultrastructura și biomecanica celulelor eucariote. Astfel, Bessis și Brenton-Garlos (1967), precum și Malech și colab. (1977) au arătat că neutrofilele migratoare au o structură internă înalt organizată, cu un nucleu situat în regiunea posterioară a celulei, în timp ce majoritatea citoplasmei, care conține granulațiile, este grupată între nucleu și pseudopodul care înaintează. Depuse pe suprafața unui filtru de nitroceluloză, ele emit numeroase extensii pseudopodale, care intră în matricea filtrului, antrenînd restul celulei (fig. 73).

Gallin (1980), confirmînd aceste date, a demonstrat că procesele de chemotaxie se însoțesc de o reorganizare a topografiei diferitelor structuri intracelulare și a atras atenția asupra rolului potențial al acestora.

Moleculele matricei celulare și rolul lor în mobilitatea neutrofilelor. Contrar concepțiilor mai vechi, citoplasma neutrofilelor, ca și cea a altor celule eucariote este un ansamblu bine structurat, datorită existenței unei matrice proteice fibrilare, care o traversează de la nucleu spre suprafața internă a membranei plasmatice. Ea influențează forma, structura, transportul intracelular, diviziunea, locomoția și chiar unele proprietăți

metabolice (Weber și Osborn, 1985). Componentul dominant cantitativ este reprezentat de o rețea extinsă de actină, legată de o serie de macromolecule abundente de *proteine de legare a actinei*. Forma sa monomeră, globulară — *actina G* — are potențial de polimerizare, pentru a forma molecule lungi, dublu helicale de *actină F* (fibrilară), în prezența ATP, care furnizează energia necesară pentru polimerizare. Lanțul de actină F este polarizat, în sensul că se polimerizează și se alungește la o extremitate (+) și se depolimerizează la cealaltă (—). Este elementul structural esențial al microfilamentelor. Pe moleculele de actină se leagă o gamă largă de proteine, care au un rol important nu numai în configurația și în organizarea rețelei de actină, ci și în activitatea și comportarea ei.

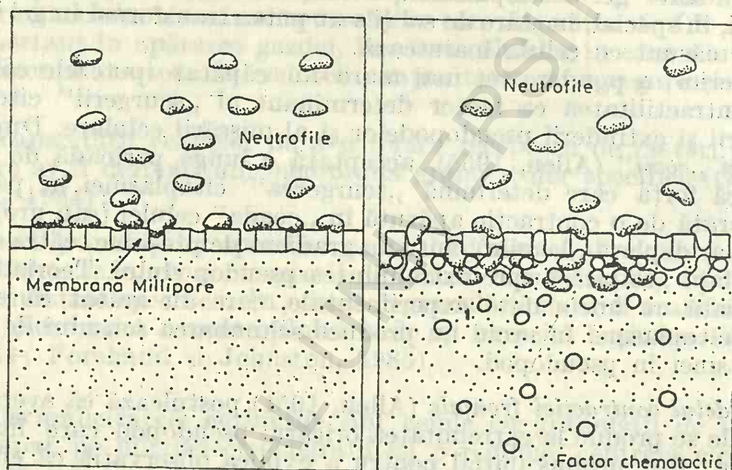


Fig. 73. — Reprezentare schematică a tehnicii de evidențiere a prezenței unui factor chemotactic (după Dias da Silva, 1986).

Au fost descrise mai multe categorii de astfel de proteine, comune de altfel tuturor tipurilor de celule eucariote mobile:

1) *proteinele de gelificare* măresc vîscozitatea actinei F purificate, prin formarea de legături suple, dar solide, între filamentele încrucișate;

2) *proteinele de asociere* leagă rigid fibrele paralele, determinînd formarea de fascicule vizibile la microscopul electronic;

3) *proteinele de reticulare* formează punți între filamentele paralele de actină;

4) *proteinele de fragmentare* se inseră între subunitățile unui filament, determinînd divizarea lui;

5) *proteinele de stabilizare* se asociază cu filamentele, acoperindu-le și protejîndu-le de fragmentare;

6) *proteinele de asamblare* permit formarea fibrelor individuale de actină F;

7) *proteinele de „coafaj"* reglează cantitatea de actină polimerizată. Ele acoperă fie extremitatea (+), fie extremitatea (—) a filamentelor, împiedicînd adiția sau eliminarea subunităților;

8) *proteinele de „capturare"* asigură o rezervă de actină G, împiedicînd-o să polimerizeze, controlînd raportul dintre actina G și actina F.

Aceste proteine intervin fie direct (proteinele de fragmentare, de asamblare, de „coafaj"), fie indirect în locomoția celulară și în mișcările interne, alungind sau scurtînd local filamentele de actină. Datorită interacțiunii lor cu actina, extractele leucocitare au caracter de gel, alcătuind o formă fibroasă de gel actinic (actina F). Gelificarea necesită Ca^{2+} și este reversibilă.

Atît mobilitatea celulei, cît și transportul intracelular sînt influențate esențial de prezența unei alte proteine legată de actină, *miozina* (Weber și Osborn, 1985). Ea este întîlnită la neutrofile în special în regiunea corticală, imediat submembranară, și în regiunile în care se formează pseudopodele (Stendahl și colab., 1980). Combinația actină — miozină pare să convertească energia chimică din ATP în mișcare de contracție. De altfel, este demonstrat că miozina este o ATPază, a cărei activitate este stimulată cînd este legată de actina F.

Cinetica modificărilor asociate cu mobilitatea neutrofilelor. Cercetări recente utilizează tehnica imaginată de Grant (1974) pentru studiul migrării neutrofilelor *in vivo*, respectiv producerea unei leziuni minime cu ajutorul unui fascicul de laser la nivelul urechii la iepure. După difuzia substanțelor inflamatorii din leziune spre vasele sanguine adiacente, neutrofilele aderă de endoteliu și migrează spre țesuturile lezate.

Utilizînd tehnici moderne, Schmid-Schönbein și Skalak (1986) propun următorul mecanism de mobilitate a neutrofilelor. În circuitul sanguin, neutrofilele sînt normal purtate pasiv de forțele hidrodinamice, în timp ce în cursul extravazării și în țesuturi, locomoția este activă. Evenimentul crucial al mobilității lor este formarea de *protopode* (*pseudopode*), prelungiri de citoplasmă și membrană plasmatică, mai mari decît perimetrul celulei nedeformate. Prima etapă în migrare este trecerea pseudopodului printre celulele endoteliale (*diapedeza*), deplasarea făcîndu-se prin legarea și desprinderea de un substrat însoțită de relaxare. După cum a demonstrat Fung (1981), membranele plasmatice au un rol fundamental în mecanica celulară, dar, în același timp, prezintă o rezistență mare la creșterea prin extensie a suprafeței lor. Schmid-Schönbein (1986) a demonstrat că în medii izotonice, neutrofilele au un excedent de membrană față de ceea ce este necesar pentru a acoperi citoplasma lor dacă s-ar găsi sub forma unei sfere regulate. Suprafața membranară în exces este prezentă sub forma unor pliuri, numeroase pe suprafața celulei, care pot depăși cu 80 — 100% volumul normal al acesteia. Creșterea s-ar face prin încorporare de membrană din organitele interne sau prin sinteză metabolică, deși aceasta reprezintă un proces mai lent. *In vitro*, formarea și retracția protopodelor este un proces ciclic, care se produce în diferite regiuni ale celulei prin deplierea membranei celulare, în așa fel încît, uneori, o singură celulă poate prezenta protopode în stadii diferite de formare și de retracție (fig. 74). Citoplasma din pseudopode conține o structură fibroasă, orientată în direcția prelungirii, datorită orientării moleculelor în matricea gelificată.

Formarea pseudopodelor este un proces lent. Viteza de creştere în raport cu centroidul celulei este de ordinul a 5 μm/minut, la temperatura de 22°C. Pentru a atinge această viteză longitudinală este suficientă asamblarea într-un polimer a cîtorva molecule de actină pe secundă.

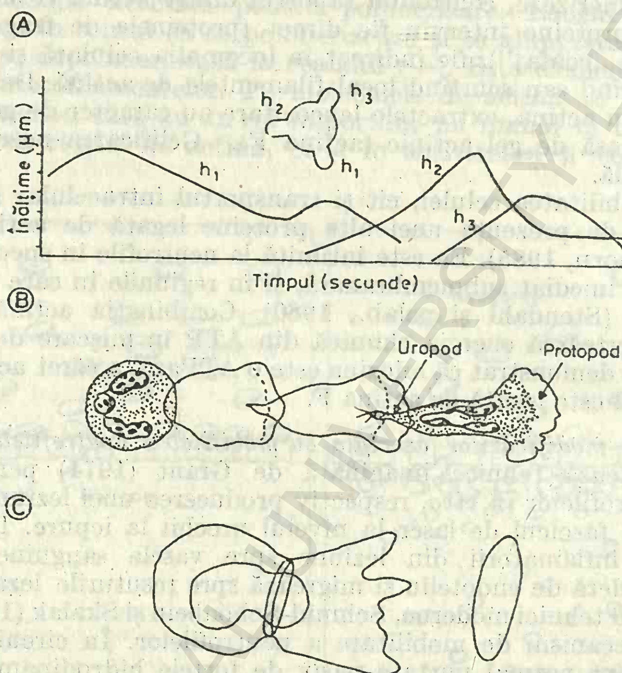


Fig. 74. — Biomecanica leucocitelor neutrofile. A. Formarea şi retracţia protopodelor este un proces ciclic, ce se produce succesiv în diferite puncte ale suprafeţei celulare. Figura prezintă comportarea unui neutrofil uman liber în suspensie. B. Etapele succesive ale înaintării unui neutrofil mobil. C. Reprezentare schematică a interfeţei, în cursul formării „gîtuiturii".

După Stossel (1982), în celulele normale actina ar exista într-o formă fragmentată, fiecare fragment fiind format din mai multe monomere. Microelectronografiile sugerează că în modificările de formă ale protopodelor, pe lîngă polimerizare, un rol important ar avea o oarecare aliniere a fragmentelor din reţeaua citoscheletului.

După Schmid-Schönbein, Skalak şi Chien (1986), protopodul are o citoplasmă rigidizată spre deosebire de restul celulei. La baza lui există o zonă de tranziţie — interfaţa — care împarte celula în două regiuni: regiunea cu citoplasmă nepolimerizată şi protopodul propriu-zis. Existenţa interfeţei, care este sediul activităţii de polimerizare, se exteriorizează prin formarea unei „gîtuituri" („Neck") pe suprafaţa neutrofilului (fig. 74), care circulă cu o viteză de ~5,6 μm/minut, de-a lungul corpului principal al celulei. „Gîtuiturile" se observă frecvent la celulele care migrează prin ţesuturi şi pot ajuta neutrofilele „să alunece" printre joncţiunile endoteliale.

În concluzie, prin starea lor funcțională diferită în regiunea anterioară față de cea posterioară a celulei și prin capacitatea de contracție (în asociere cu miozina), microfilamentele formează suportul structural și forțele dinamice care determină mobilitatea neutrofilelor.

Microtubulii nu au rol direct în mobilitate (Werb și Goldstein, 1984). Ei formează „eșafodajul" intern de mărire a rigidității celulare, de repartiție a granulațiilor, stabilind forma celulei în mod normal și în timpul locomoției și asigurînd persistența mișcării într-o anumită direcție în absența gradientului chemotactic (Gallin, 1980).

Etapele procesului de fagocitoză

De la descoperirea lui, procesul de fagocitoză a fost urmărit de numeroși cercetători, care au descris principalele etape consecutive injectării de celule bacteriene sau particule organice, capabile să determine un proces inflamator local (fig. 75).

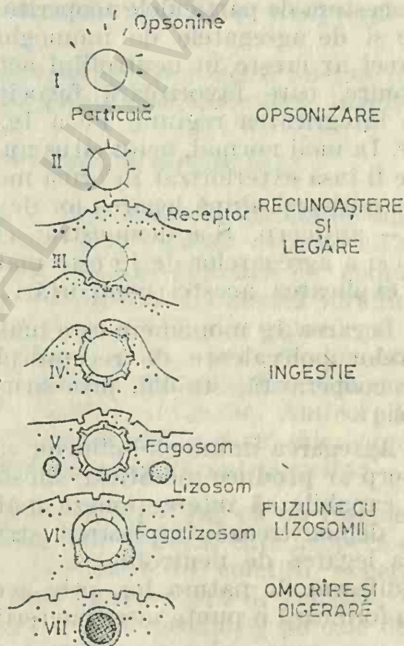


Fig. 75. — Reprezentare schematică a etapelor procesului de fagocitoză (după Werb, 1984).

Recunoașterea și opsonizarea

Neutrofilele poartă pe suprafața membranei plasmatice mai multe tipuri de receptori, capabili să lege diferite molecule ce pot interveni în declanșarea și intensificarea fagocitozei. Se admite că, probabil, cele mai multe tipuri de receptori sînt încă neidentificate. De asemenea, natura lor biochimică este încă necunoscută, unii autori considerînd că receptorii ar

fi formați din molecule mici, specifice, în timp ce alții îi consideră structuri complexe, intramembranare. Receptorii de suprafață ai neutrofilelor pot fi considerați ca „unități de recunoaștere", capabile să lege o serie de „unități efectoare" ce declanșează funcțiile celulare specifice.

Opsonizarea (gr. „opson" = aliment, „opsonein" = a pregăti alimentele) este procesul de „sensibilizare" specifică sau nespecifică a bacteriilor, a altor celule sau antigene particulate față de acțiunea fagocitelor. Descoperit de Wright (1902), acest proces evidențiază, odată în plus, interrelațiile dintre mecanismele de apărare celulare și umorale ale organismului față de agresiunile bacteriene.

Au fost descrise trei mecanisme principale:

1) *Opsonizarea mediată exclusiv de anticorpi* se realizează prin acțiunea imunoglobulinelor din subclasele IgG1 și IgG3, prezente la animalele și la omul imunizat. Ele ar funcționa ca opsonine termostabile, prin intermediul regiunii Fc. Receptorii pentru Fc, încă neizolați și neidentificați chimic, pot fi evidențiați indirect, prin microscopie cu fluorescență. Ei ar fi prezenți pe ~75—90% din neutrofilele circulante, permițînd legarea acestora de particulele acoperite de IgG, de complexele antigen — anticorp și de agregatele de imunoglobuline. Mobilitatea lor în planul membranei ar crește în neutrofilul activat în așa fel încît ar permite o redistribuire, care favorizează fagocitoza complexelor imune. Legarea necesită integritatea regiunii Fc a Ig, care poartă situsul de legare pe receptor. În mod normal, acest situs nu este disponibil pe molecula nativă. El poate fi însă exteriorizat în urma modificărilor sterice suferite de moleculele de anticorp, după legarea lor de antigene pentru a forma complexe antigen — anticorp. S-a demonstrat că legarea complexelor antigen — anticorp și a agregatelor de Ig este mai intensă decît cea a Ig monomere. Pentru explicarea acestei comportări au fost propuse două ipoteze:

a) Legarea Ig monomere este mai instabilă în comparație cu legarea complexelor polivalente de receptorul Fc, deoarece acestea ar realiza o legare cooperantă, stabilă, prin situsuri Fc, provenite de la mai multe molecule.

b) Agregarea imunoglobulinelor sau legarea lor în complexe antigen — anticorp ar produce modificări alosterice în conformația Ig, exprimînd situsuri capabile să interacționeze mai strîns cu suprafața neutrofilelor. Aceasta demonstrează implicarea structurii terțiare a Ig, care poate influența legarea de neutrofile.

Indiferent de natura lor, prin aceste mecanisme, moleculele de Ig-anticorp formează o punte între bacterii și neutrofil, favorizînd fagocitoza.

2) *Opsonizarea prin anticorpi specifici asociați cu sistemul complement.* Complementul constituie al doilea grup important de opsonine serice prezente și la animalele normale. Activitatea opsonizantă s-ar datora fragmentului C3 și în special produșilor săi de clivare, C3a și C3b. La om, receptorii de C3 sînt prezenți pe ~90% din neutrofile. Ei sînt mobili în planul membranei plasmatice și agregarea lor ar fi o precondiție pentru a mări citoaderența dependentă de C3. În cursul acestui tip de opsonizare, o cantitate de Ig, insuficientă pentru a opsoniza pe cont

propriu, poate reacționa cu celulele bacteriene, amorsînd secvența clasică de activare a complementului. Componentul C3 activat pe suprafața bacteriilor servește ca punte între bacterii și fagocit, dar este insuficient pentru a stimula eficient fagocitoza. Eficiența ar fi condiționată de participarea unui număr mai mare de receptori C3 și de intervenția unor factori umorali capabili să activeze receptorii, determinînd redistribuirea lor în membrana celulară.

IgM sînt lipsite de putere opsonizantă în absența complementului, deoarece neutrofilele nu au receptori de IgM. În prezența complementului însă, ar avea o activitate opsonică puternică, datorită capacității lor de a fixa primii patru componenți ai căii clasice de activare, respectiv C1, C4, C2 și C3.

3) *Opsonizarea nespecifică*. Al treilea mecanism de opsonizare, activ și la animalele normale neimunizate, opsonizarea nespecifică, implică participarea componentului C3 activat pe calea alternativă. În special componentul C3b, produs prin activarea directă de către polizaharidele bacteriilor Gram-negative, de fungi etc., se leagă de suprafața acestora pentru a fi recunoscute de către neutrofile, mediind aderența fermă a bacteriilor de fagocit, prin interacțiunea dintre C3b și receptorul respectiv de pe suprafața neutrofilelor.

Nefiind dependent de prezența anticorpilor, acest mod de opsonizare ar avea un rol important în stadiile precoce ale infecțiilor, înainte de apariția anticorpilor specifici.

Procesul de opsonizare este stimulat și pe alte căi :

Rolul anticorpilor „naturali". Sub această denumire sînt reuniți anticorpii prezenți în ser în absența unui contact evident cu antigenul specific corespunzător. Prezența lor este determinată de contacte accidentale cu microorganisme avînd o structură antigenică înrudită. Drutz și Mills (1984) dau ca exemplu faptul că ~80% din oameni au anticorpi față de pneumococul de tip VII, deși frecvența purtătorilor este doar de ~1%. Anticorpii respectivi s-ar datora contactului frecvent cu anumite tulpini de *Streptococcus viridans*, înrudite antigenic. Anticorpii naturali pot participa în apărarea de infecții, în special în cazul microorganismelor care nu dispun de factori de suprafață cu efect antifagocitar.

Rolul tuftsinei. Experimental s-a demonstrat că un fragment rezultat din degradarea imunoglobulinelor, leucokinina, care acoperă suprafața neutrofilelor, exercită un efect opsonizant în condiții experimentale. Fracțiunea activă a leucokininei este reprezentată de *tuftsină*, un tetrapeptid (Thr, Lys, Pro, Arg), care a fost produs și pe cale de sinteză. El ar fi eliberat din molecule de leucokinină sub acțiunea unei enzime din membrana neutrofilului. Tuftsina ar fi sintetizată, în mod normal, în splină, fapt care explică parțial sensibilitatea bolnavilor splenectomizați la infecții.

Rolul fagocitozei de suprafață. Fagocitoza de suprafață este un proces prin care bacteriile infectante ar fi „capturate" între mai multe neutrofile, între neutrofile și suprafața țesuturilor sau, împreună cu neutrofilele, în interstițiile cheagurilor de fibrină (Drutz și Mills, 1984). Procesul

compensează lipsa anticorpilor din primele 5—6 zile de la infecție și își adaugă acțiunea celei a sistemului complement activat pe calea alternativă. Fagocitoza de suprafață este mai puțin eficientă în regiunile în care neutrofilele nu sînt strîns apropiate, ca, de exemplu, în lichidele pleurale, peritoneale, pericardice, articulare și cefalorahidian.

Mecanismul opsonizării. Opsonizarea ar favoriza fagocitoza prin mărirea hidrofobicității particulelor și, respectiv, prin reducerea forțelor de repulsie dintre microorganisme și neutrofile, ambele încărcate negativ. Dovada indirectă o constituie observația că bacteriile avirulente au suprafețe relativ hidrofobe, care favorizează fagocitoza, în comparație cu cele virulente, rezistente la înglobare, care au suprafețe hidrofile. De altfel, multe bacterii patogene posedă o serie de substanțe de suprafață cu acțiune antiopsonizantă (polizaharide capsulare, polipeptide capsulare, fimbrii, proteine de tip special), care explică rezistența lor relativă la fagocitoză (fig. 76).

Componentul C3 ar fi implicat, în special, în procesul de recunoaștere, neutralizare a repulsiei electrostatice, favorizare a contactului și aderenței cu neutrofilul. În mod paradoxal, Ig-anticorp ar fi mai puțin eficiente în recunoaștere, dar ar acționa în special pentru inducția fagocitozei optime. După Werb și Goldstein (1984), neutrofilele pot îngloba diferite particule și în absența Ig, a C3 sau a altor factori opsonizanți. Este probabil că, în aceste cazuri, componentul favorizant ar fi reprezentat de însăși suprafața particulelor respective, care ar include anumite regiuni ce s-ar comporta ca un „surogat de Ig”, care permite contactul cu fagocitul și stimulează înglobarea.

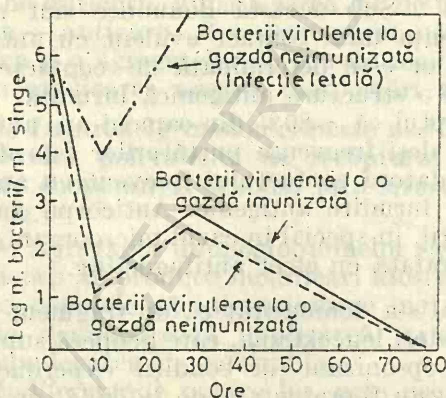


Fig. 76. — Reprezentare schematică a ritmului de dispariție din circulație a bacteriilor, în organisme imunizate și neimunizate. La gazdele imunizate, bacteriile virulente dispar la fel ca și bacteriile avirulente în organisme neimunizate.

Deficiențele funcției de opsonizare. Diminuarea capacității de opsonizare și consecința ei, creșterea sensibilității la anumite infecții, au fost observate la persoane cu deficit de C3 sau cu disfuncții ale căii alternative de activare a complementului. Acest tip de deficiență este corectat prin administrarea terapeutică de plasmă sanguină. Lipsa opsoninelor și, în unele cazuri, prezența complexelor imune pot, de asemenea, explica anomaliile funcției fagocitare în unele boli (anemia falciformă, artrita reumatoidă, lupusul sistemic eritematos). De asemenea, au fost descrise

anomalii primare ale funcției fagocitare la ~5—10% din populația aparent sănătoasă și ceva mai frecvente (~20%) la persoane cu infecții recurente ale căilor respiratorii sau gastrointestinale (Haeney, 1984).

Chemotaxia

Deplasarea orientată a polimorfonuclearelor a fost observată inițial de oftalmologul german Leber (1888), prin introducerea unor tuburi capilare fine, care conțineau o cultură omorîtă de *Staphylococcus aureus*, în camera anterioară a ochiului de iepure. El a descris deplasarea leucocitelor din toate direcțiile spre corneea avasculară, prin migrarea lor în linie dreaptă spre iritant, pătrunzînd și în tuburile capilare. Natura acestui proces și corelarea lui cu mobilitatea celulelor a fost sesizată de Metchnikoff (1892).

Nomenclatură. Pentru caracterizarea diferitelor influențe asupra motilității leucocitelor se folosesc următorii termeni (Keller și colab., 1977);

Deplasarea (locomoția) la întîmplare („random locomotion") corespunde tipului de mobilitate complet aleatoriu. Axul de deplasare a celulei are o poziție variabilă, fiind neorientat în raport cu un anumit stimul.

Chemokineza corespunde tipului de reacție în care viteza de locomoție și/ sau frecvența și amploarea schimbărilor de direcție a celulelor sînt influențate de substanțe anumite din mediu. Chemokineza poate fi crescută «+» sau scăzută «—» și corespunde unei migrări întîmplătoare într-o concentrație uniformă de atractant sau de repelent (McCutcheon, 1946). Mediatorii chemokinetici sînt numiți *factori chemokinetici* sau *citokinezine*.

Chemotaxia corespunde capacității leucocitelor polimorfonucleare de a recunoaște și de a răspunde la un gradient chimic adecvat cu o migrare orientată. Direcția de locomoție poate fi orientată fie în sensul atracției spre zona în care substanța activă (atractant) se găsește în concentrație mai mare (respectiv reținerea celulelor la concentrații mai mari de substanță activă și evitarea zonelor cu concentrație joasă), fie în sens invers, în cazul substanțelor repelente. Mediatorii acestui tip de influență sînt numiți *substanțe chemotactice* (Boyden, 1962), *citotaxine* (Keller și Sorkin, 1967) sau *factori chemotactici* (Ward și Becker, 1968).

Atractanții. Capacitatea de a atrage polimorfonuclearele este proprie unei largi categorii de substanțe ca: produșii de natură bacteriană, lipidele oxidate, proteinele denaturate, complexele antigen—anticorp, fragmentele de colagen, elastina, produșii eliberați din limfocitele T și B activate, produșii sistemelor de coagulare și de fibrinoliză. Un rol esențial revine componenților solubili ai sistemului complement, produși prin clivarea proteinelor native după activarea acestuia, pe calea clasică sau alternativă.

Primul eveniment al chemotaxiei este reprezentat de detectarea stimulului chemotactic. Datorită prezenței unui număr important de receptori specifici (~10^5/ celulă) pentru factorii chemotactici, neutrofilele

pot „simţi" prezenţa variaţiilor unui gradient de concentraţie de ~1% de-a lungul dimensiunilor lor (Zigmond, 1977). Existenţa receptorilor pentru chemoatractanţi a fost evidenţiată la neutrofilele de iepure, de Aswanikumar şi colab. (1977), iar la om de Williams şi colab. (1977). Nu se ştie încă dacă leucocitele umane prezintă o serie de receptori dispuşi de-a lungul membranei sau dacă există un singur receptor mobil în stratul dublu fosfolipidic membranar.

Pe lîngă influenţa asupra direcţiei de deplasare a leucocitelor, chemotaxia amorsează o serie complexă de evenimente, ca, de exemplu : 1) mărirea adezivităţii ; 2) scăderea sarcinii electronegative de suprafaţă ; 3) translocaţia cationilor monovalenţi (Na^+, K^+) şi bivalenţi (Ca^{2+}) ; 4) intensificarea metabolismului oxidativ ; 5) producerea de radicali de anioni superoxid ; 6) degranularea leucocitelor cu descărcarea selectivă de constituenţi lizosomali etc. (Gallin, 1980).

Rolul cel mai important îl are componentul C5a (activ în concentraţia de 5 — 10 nanograme la litru), urmat de C3a, C3b, complexul C5b,6,7 şi produşii săi de degradare. Importanţa lor a fost demonstrată de cazurile în care producerea de C3a, C5, C6, C7 este diminuată, la bolnavi cu deficienţe genetice primare sau secundare care alterează căile de activare clasică sau alternativă ale complementului (Haeney, 1984). O activitate chemotactică intensă are polipeptidul sintetic de tip f-Met-Leu-Phe care conţine N-formil metionină, activă în concentraţie de 0,01 — 0,1 nmol/l (Drutz şi Mills, 1984).

Chemotaxia *in vitro* şi *in vivo* este asociată cu unele efecte adiţionale ca, de exemplu, o reorganizare a topografiei diferitelor structuri intracelulare implicate în mobilitatea polimorfonuclearelor (Malech, 1977).

Chemotaxia negativă. Unele substanţe sînt chemotactic negative şi împiedică atracţia leucocitelor de către substanţele cunoscute ca agenţi chemotactici. Între acestea sînt citate : fluorurile, iodoacetatul, ionii arsenit etc., care ar acţiona prin inhibarea glicolizei anaerobe, principala sursă de energie a celulelor fagocitare. Un rol important în evoluţia infecţiilor cu *Streptococcus pneumoniae* au polizaharidele capsulare care, prin acţiunea lor chemotactic negativă, împiedică fagocitarea şi distrugerea bacteriilor, mărind virulenţa acestora şi implicit gravitatea infecţiilor.

Chemotaxia este inhibată de unele limfokine, ca şi de unele enzime proteolitice produse în cursul activării sistemului complement sau a sistemului fibrinolitic. Un efect similar are prezenţa în ser a unor inhibitori care acţionează direct asupra neutrofilelor, făcîndu-le incapabile să reacţioneze la stimuli chemotactici, sau blocînd formarea şi/ sau inactivarea factorilor deja produşi. Prezente în general în concentraţii mici, substanţele inhibitoare pot ajunge în concentraţii mai mari în cursul anumitor boli.

Teste pentru chemotaxie. Identificarea substanţelor chemotactic pozitive şi cuantificarea locomoţiei neutrofilelor în raport cu diferiţi stimuli pot fi efectuate cu ajutorul camerei de chemotaxie imaginată de Boyden (fig. 63). Aceasta este formată din două compartimente în care sînt introduse suspensia de neutrofile şi respectiv soluţia de chemotaxine

separate de un filtru de membrană Millipore. Neutrofilele ce se îndreaptă spre soluţia de chemotaxine sînt „capturate" de filtru în cursul traversării acestuia. După o perioadă anumită de incubaţie se evidenţiază prezenţa şi numărul lor pe suprafaţa opusă a membranei, prin examinarea la microscop după colorare.

Conceptual simplă, tehnica prezintă o serie de dezavantaje legate de dificultăţile de cuantificare a rezultatelor: 1) unele leucocite pot traversa complet filtrul, migrînd în soluţia chemotactică; 2) altele nu îl pot traversa datorită greutăţii de a găsi un filtru cu o porozitate cu Ø adecvat procesului.

Tehnica migrării radiare în gel de agaroză permite aprecierea deplasării întîmplătoare şi/ sau orientate a leucocitelor depuse într-un godeu al unei plăci Petri, care conţine agaroză, în direcţia substanţei chemotactice depusă în alt godeu, la distanţă, spre periferia plăcii, comparativ cu o substanţă martor, inertă. După cîteva ore se măsoară distanţa faţă de centru a celulelor aflate în poziţia cea mai înaintată.

Anomaliile chemotaxiei

Chemotaxia poate fi alterată de diferite cauze ca:

1) Anomalii celulare primare prin deficit de sinteză a unor glicoproteine celulare, disfuncţii ale actinei, sindromul leucocitelor „leneşe" inerte, fără activitate („lazy leukocytes").

2) Anomalii celulare secundare, în diabet, arsuri, intoxicaţii cu alcool, cancer, artrită reumatismală, hipofosfatemie, infecţii cu virus gripal de tip A.

3) Anomalii de producere a factorului chemotactic, absenţa substanţei antagoniste a inhibitorului factorului chemotactic.

4) Prezenţa unor inhibitori ai factorului chemotactic, în cancer, ciroză, lepră, boala granulomatoasă cronică sau a autoanticorpilor pentru neutrofile.

Aderenţa şi diapedeza

Răspunsul polimorfonuclearelor la invazia microorganismelor sau la unele leziuni tisulare şi migrarea lor extravasculară necesită aderarea lor fermă, prealabilă, de suprafaţa endoteliilor din venulele postcapilare (Iosekutz, 1984). Acest proces, denumit *marginare*, poate fi indus de factorii eliberaţi din celulele lezate şi reprezintă o precondiţie pentru migrarea neutrofilelor în regiunile lezate.

Adezivitatea neutrofilelor este mărită de plasma bolnavilor cu leziuni inflamatorii, de cGMP, de cationii de Ca^{2+} şi de unele substanţe chimice ca propranololul (Forehand şi Johnston, 1985). Ea este diminuată de cAMP, de etanol, epinefrină, anestezice locale, ca şi de plasma bolnavilor trataţi cu substanţe antiinflamatoare (corticosteroizi, salicilaţi etc.).

Alterarea aderenţei neutrofilelor poate fi determinată de boli congenitale legate de sex sau, uneori, recesiv autosomale, care ar determina, probabil, lipsa proteinei *Mol α*.

Migrarea extravasculară. Polimorfonuclearele neutrofile „marginate” aderente de suprafața endoteliilor se deformează datorită motilității crescute și, luînd o orientare caracteristică, „se strecoară” printre celulele endoteliale trecînd în țesutul conjunctiv inflamat (fig. 77).

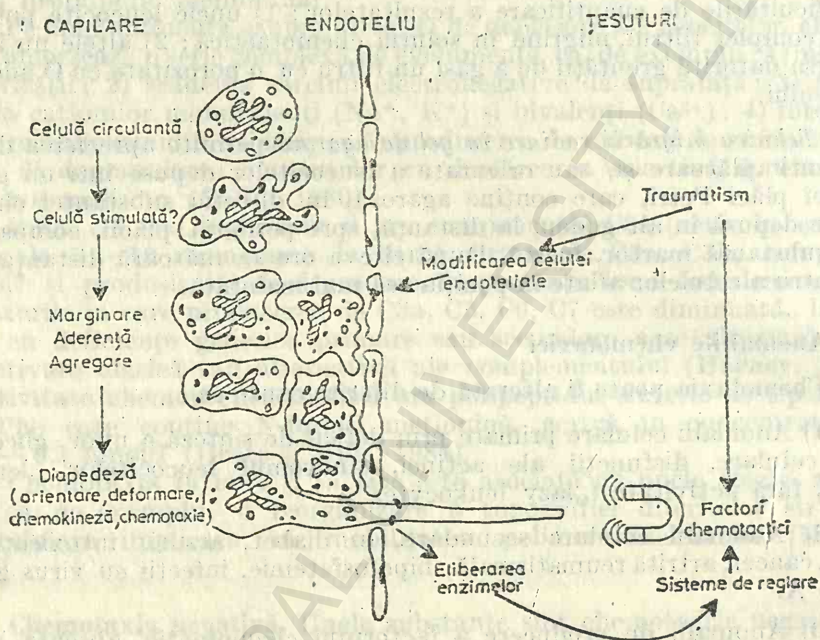


Fig. 77. — Reprezentare schematică a fenomenelor implicate în atragerea leucocitelor polimorfonucleare în focarele inflamatorii (după Gallin, 1980).

Endocitoza

Contactul celulelor bacteriene cu neutrofilele și opsonizarea determină activarea structurilor submembranare cu rol în biomecanica fagocitelor. Ele determină formarea unor pseudopode, care se deplasează în jurul bacteriilor, altor particule sau celule fagocitabile, înconjurîndu-le progresiv, pentru ca, final, extremitățile distale ale pseudopodelor să fuzioneze, înglobînd bacteria sau particula într-o *veziculă fagocitară* sau *fagosom*. Fenomenul de înglobare necesită deci interacțiunea secvențială între liganzii opsonici, distribuiți omogen pe suprafața bacteriei, pe de o parte, și receptorii de pe fagocit, pe de alta. Înglobarea este condiționată de o interacțiune cu caracter continuu, circumferențial, care funcționează printr-un mecanism ca de fermoar („zipper-like mechanism”) (fig. 78). În cazul în care această legătură este numai parțială, limitată la o porțiune din suprafața celulei bacteriene, aceasta rămîne numai legată de neutrofil, fără a fi înglobată. După înglobare, vezicula fagocitară se deplasează spre interiorul celulei, prin intermediul microtubulilor. Procesul necesită consum de energie, care este furnizată de glicoliza anaerobă. Energia

mecanică este reprezentată de interacțiunile complexe dintre proteinele contractile din citoplasmă (actină, miozină) și membrana celulară.

Funcția de endocitoză a neutrofilelor este alterată în cazul unor *anomalii celulare primare*, ca, de exemplu, în polimerizarea anormală a actinei, care antrenează tulburări în capacitatea de formare a pseudopodelor, sau în deficiențele de formare a glicoproteinelor membranare. Ea este, de asemenea, perturbată în *anomaliile celulare secundare* (diabet, infecții virale, terapie cu corticosteroizi etc.), ca și în cazul deficiențelor în opsonizare (prin lipsa Ig sau prin deficit de C3).

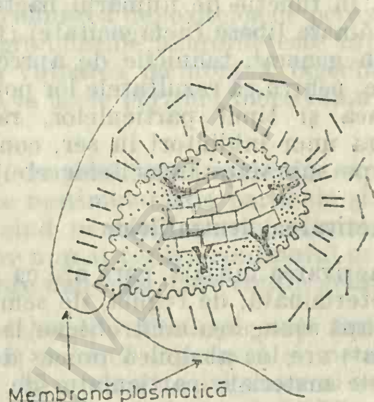


Fig. 78. — Reprezentare schematică a unei porțiuni dintr-un leucocit neutrofil, evidențiind înglobarea unei grămezi de bacterii opsonizate: Membrana neutrofilului este „activată" de molecule de anticorpi și de complement (componentul C3b). Polimerizarea consecutivă a proteinelor contractile din citoplasmă la microfilamente și microtubuli contribuie esențial în acest proces (după Waldman, 1979).

Testarea activității opsonizante și de endocitoză

Estimarea capacității de endocitoză, fază esențială a procesului de fagocitoză, este deosebit de importantă, pentru că permite o evaluare a eficienței fazelor anterioare ale procesului care o condiționează. Pentru stabilirea ei au fost imaginate o serie de tehnici, bazate pe numărarea directă a microorganismelor înglobate, a celor rămase libere în mediu, estimarea radioactivității legate de celule după ingestia unor particule marcate etc.

In vivo, activitatea opsonizantă poate fi studiată injectînd, spre exemplu, la șoarece i.v. o cantitate cunoscută de bacterii (*Salmonella typhimurium*) sau hematii marcate radioactiv cu ^{131}I și după 10 minute o doză suficientă de anticorpi pentru a produce un efect opsonizant optim. Intensitatea opsonizării se apreciază în funcție de distribuția bacteriilor în diferite organe (ficat, splină, pulmoni etc.) și după cinetica de epurare sanguină a radioactivității, măsurată prin formula:

$$K = \frac{\log C - \log C1}{t1 - t}$$

în care: K = constanta de epurare,

C și C1 = concentrația radioactivității în momentul injectării (t) și în momentul recoltării probei (t1) (Biozzi și colab., 1960).

După opsonizare, procentul bacteriilor fagocitate crește în celulele sistemului fagocitar mononuclear din ficat și scade în cele din splină. În

cazul unor doze mari de bacterii crește numărul bacteriilor fixate în pulmon. Paralel, constanta de epurare a radioactivității crește de la valoarea medie de 0,017 la 0,043, în cazul utilizării *S. typhimurium*.

In vitro, opsonizarea este studiată punînd în contact celulele fagocitare (polinucleare sau macrofage) din exsudatele peritoneale provocate artificial la animale de laborator cu bacterii, hematii etc. cu anticorpii corespunzători. După incubare se apreciază efectul opsonizant, în raport cu o reacție martor (în absența anticorpilor sau altor substanțe opsonizante), în funcție de numărul bacteriilor înglobate în leucocite și/sau al celor rămase libere (nefagocitate) (Peltier, 1974).

În general, tehnicile de apreciere a capacității de endocitoză sînt relative, pentru că rezultatele lor pot fi influențate de numeroase variabile (mărimea și tipul particulelor, raportul cantitativ particule/fagocite, prezența unor inhibitori în ser, considerarea, ca fagocitate, a bacteriilor fixate pe suprafața fagocitelor etc.).

Activarea neutrofilelor

Activarea inițială, care are ca efect afluxul neutrofilelor în țesuturi, este determinată, de regulă, de semnalele emise de moleculele chemotactice. După ajungerea neutrofilelor la locul de origine al semnalelor (țesutul inflamat) are loc al doilea proces de activare, mai extins și mai viguros, indus de materiale particulate (de exemplu, celulele bacteriene) sau de complexele imune pe care neutrofilele le recunosc ca fagocitabile. Activarea este urmată de *degranulare*, respectiv de un proces de eliberare a enzimelor și altor constituenți din structura granulațiilor în fagosomul (vezicula fagocitară) nou format, pentru a da naștere unui fagolizosom.

Activarea se poate realiza pe două căi majore :

A) **Activarea prin fagocitoză** este amorsată de procesul de recunoaștere și opsonizare, care induce formarea de pseudopode și degranularea. În urma ei se eliberează două categorii de produși (tabelul nr. 31).

Tabelul nr. 31

Produșii eliberați de neutrofilele umane stimulate (după Baggiolini și Dewald, 1985)

Produșii preformați	Produșii nou formați
Gelatinaza și, probabil, alte enzime stocate în organitele secretorii mici.	Superoxidul, peroxidul de hidrogen și alți metaboliți ai oxigenului, formați pe calea NADPH-oxidazei.
Proteina de legare a vitaminei B_{12}, colagenaza, lactoferina și lizozimul, stocate în granulele specifice.	Produșii de oxigenare ai acidului arahidonic : TxA2 și PGE2 formați pe calea ciclo-oxigenazei ; LTB4 formată pe calea lipooxigenazei.
Hidrolazele acide, mieloperoxidaza, proteinazele serinice neutre și lizozimul, stocate în granulele azurofile.	Factorul de activare a plachetelor, format de la lizoplasmalogeni, pe calea unei acetil-transferaze.

1) *Produșii preformați, prezenți în organite și la celulele în repaus*, sînt reprezentați, în special, de enzime și alte macromolecule. Eliberarea lor se realizează, în primul rînd, prin fuziunea indusă de stimuli a organitelor subcelulare de depozit — granulațiile — cu plasmalema. Baggiolini și Dewalt (1985) deosebesc două tipuri de eliberare :

a) *Eliberarea fagocitară* („Phagocytic release"), care corespunde situației în care granulațiile fuzionează cu vacuola fagocitară în curs de formare, în care își descarcă conținutul. Studiul mecanismului acestui proces la microscopul electronic, după colorarea depozitelor de peroxidază, a arătat că eliberarea enzimelor din granulațiile azurofile este rapidă și masivă. Ea începe cu mult înainte ca viitoarea membrană fagocitară să se închidă spre exterior și este limitată la acele porțiuni membranare care formează o vacuolă.

b) *Secreția produșilor preformați* implică un proces de exocitoză într-o regiune a membranei plasmatice nestimulată de particule și neimplicată în înglobare. Ea se observă cînd neutrofilele sînt stimulate cu agenți solubili. De regulă, secreția apare numai pentru conținutul granulațiilor specifice și a organitelor de stocare mai mici, care conțin gelatinaza.

2) *Eliberarea produșilor nou sintetizați*. Produșii nou sintetizați sînt molecule mici, ca de exemplu : a) anionul superoxid și metaboliții reactivi ai oxigenului, derivați de la el ; b) produși de oxigenare ai acidului arahidonic formați pe calea ciclooxigenazei ; c) factorul LTB4 produs pe calea lipooxigenazei ; d) factorul activator al plachetelor sanguine PAF („*P*latelet *a*ctivating *f*actor").

Analiza biochimică a mediului extracelular al neutrofilelor activate care fagocitează permite numai evidențierea parțială a produșilor care au fost eliberați. Toți produșii care au fost eliberați în vacuolele fagocitare rămîn asociați cu celula și nu pot fi determinați. În plus, mulți compuși eliberați (de exemplu, enzimele, și în mod special mieloperoxidaza) au tendința să adere de suprafața celulelor.

B) **Activarea prin chemotaxine.** În prezent se cunosc trei clase de compuși definite chimic, cu activitate chemotactică față de neutrofilele umane : 1) anafilatoxina C5a ; 2) N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) și analogii săi și 3) leukotriena B4 (LTB 4). În prezența lor, într-un gradient de concentrație, neutrofilele iau o formă polarizată, devin mai aderente și eliberează o parte din constituenți.

Snyderman și Goetzl (1981) au arătat că neutrofilele poartă pe suprafață receptori atît pentru C5a (chemotaxine fiziologice, derivate din plasmă), cît și pentru fMLP și analogii săi, care reprezintă prototipul agenților chemotactici derivați din bacterii. Leukotriena B4, ca și factorul de activare a plachetelor, sînt produse ale neutrofilelor activate, care acționează ca o chemotaxină față de celulele care le-a produs. Baggiolini (1985) le încadrează în categoria autocoizilor („Autocoids").

Recent, Baggiolini, Bretz și Dewald (1982, 1985) au evidențiat prezența în neutrofilele umane a unui compartiment secretor de depozit, caracterizat în special prin prezența gelatinazei. Ei au stabilit următoarele particularități de comportare : 1) eliberarea gelatinazei, mult mai rapidă

și mai intensă decît a altor molecule depozitate, poate fi folosită ca un marker al răspunsului secretor; 2) aceasta este totdeauna însoțită, chiar dacă la un nivel scăzut, de o eliberare a proteinei de legare a vitaminei B_{12} din granulele specifice.

Testarea capacității de degranulare se poate face prin tehnica fagocitozei „împiedicate" („Frustrated phagocytosis"), care constă în punerea în contact a suspensiei de neutrofile de studiat, pe o suprafață de plastic sau pe o placă Petri, cu agregate de imunoglobuline sau complexe imune, în condiții în care acestea nu pot fi „ingerate" (fig. 294). Neutrofilele sînt stimulate de contactul Ig cu receptorii corespunzători, fapt care determină fuziunea granulațiilor leucocitare cu membrana celulară și descărcarea conținutului lor în mediul de suspensie. În felul acesta se testează viteza de eliberare a enzimelor β-glicuronidaza și fosfataza acidă, raportînd-o la o probă martor de neutrofile normale.

După Stites (1984), moartea celulelor prin citoliză nespecifică poate fi apreciată prin descărcarea în mediu a enzimei lactic dehidrogenaza prezentă în afara granulațiilor. Viteza de degranulare este întîrziată în diferite disfuncții ca boala granulomatoasă cronică etc.

„Cascada" respiratorie

Procesul de fagocitoză este asociat cu declanșarea unei „cascade" respiratorii explozive („Respiratory burst"), corespunzînd punerii în funcțiune a unor căi metabolice latente în neutrofilele în repaus. Ea are rolul de a produce un grup de agenți microbicizi înalt reactivi, prin reducerea parțială a oxigenului (fig. 79). După Drutz și Mills (1984), acest proces ar fi independent de înglobarea particulelor și ar fi asociat cu orice perturbare a membranei plasmatice (inclusiv contactul ei cu N-formil-metionilpeptidele).

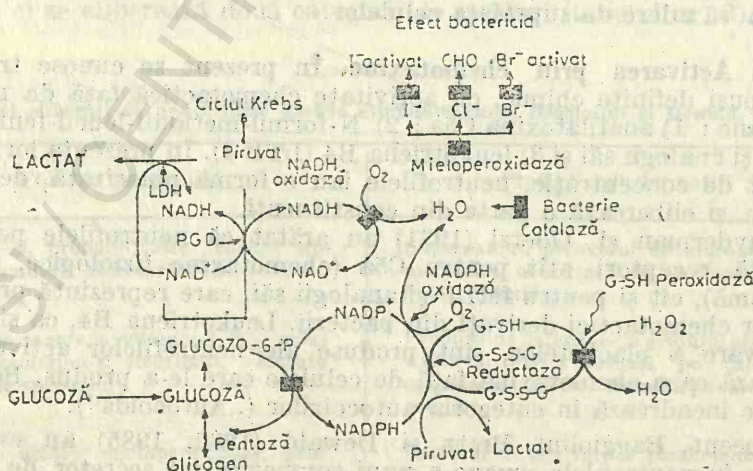


Fig. 79. — Reprezentare schematică a reacțiilor metabolice intraleucocitare asociate cu bactericidia.

„Cascada" respiratorie are patru faze a căror existență a fost demonstrată cu ajutorul inhibitorilor metabolici : 1) creșterea imediată a consumului de O_2; 2) oxidarea crescută a glucozei, pe calea shuntului hexozomonofosfaților (SHMP); 3) stimularea enzimatică a NADH- și NADPH-oxidazelor și producerea de radicali superoxid (O_2^-); 4) producerea de H_2O_2 și de intermediari instabili, ca radicalii hidroxil ($OH^\bullet$) și de oxigen singlet ($^1O_2$).

În cursul acestei faze, factorii chemotactici stimulează metabolismul aerob al granulocitelor cu 25—125% și activitatea SHMP cu 100—600%.

Exocitoza

Eliberarea extracelulară a constituenților granulocitelor este un fenomen observat frecvent. Cînd neutrofilele sînt stimulate corespunzător, pe lîngă fenomenul de degranulare normală (eliberarea conținutului în interiorul vacuolelor de fagocitoză), se observă și deplasarea granulațiilor spre membrana plasmatică, fuzionarea cu aceasta și eliberarea conținutului lor spre exterior, în lichidul extracelular. Eliberarea este mai frecvent întîlnită în cursul formării fagosomilor, cînd aceștia sînt încă deschiși spre spațiul extracelular, dar legați la marginile lor interne de granulație, care își poate descărca activ conținutul. Enzimele din granulații, ca și diferiți constituenți antimicrobieni (H_2O_2, O_2^- ș.a.) pot afecta țesuturile adiacente ale gazdei, influențînd semnificativ apariția unor leziuni și contribuind la patogeneza unor boli. În același timp, acest proces poate avea un rol important în omorîrea microorganismelor neînglobate, ci doar atașate de suprafața fagocitelor. El este foarte evident în cazul infecțiilor produse de fungi, care sînt prea mari pentru a fi înglobate de neutrofile, și în cazul interacțiunilor dintre eozinofile și unii paraziți. Neutrofilele se răspîndesc pe suprafața fungilor și îi expun acțiunii diferiților constituenți eliberați prin degranulare parțială și exocitoză.

Acțiunea enzimelor degradative este potențată de MPO, care inactivează inhibitorii proteinazelor leucocitare ce atacă eficient agentul patogen. Se adaugă acțiunea unor molecule citotoxice, ca H_2O_2, care pot produce citoliza, sau, mai ales, acțiunea sistemului MPO—H_2O_2 — Cl^- sau I^-, care determină omorîrea eficientă a fungilor patogeni (Klebanoff și Clark, 1978, 1980). În același timp însă, conținutul granulațiilor (proteinaze, elastaze, colagenaze etc.) poate leza și degrada constituenți celulari locali, mai ales în cazul enzimelor active la pH neutru.

După Baintou (1980), eliberarea extracelulară a enzimelor din neutrofile, cu consecințele descrise, se poate produce și în afara procesului de fagocitoză, pe mai multe căi : 1) prin acțiunea unor agenți toxici din afara celulei („Lysis from without") ca, de exemplu, streptolizina; 2) sub acțiunea unor agenți din celulă („Lysis from within"), cum sînt cristalele de urat monosodic; 3) prin regurgitare, după înglobare; 4) fagocitoză „împiedicată" („Frustated phagocytosis"), produsă de aderarea neutrofilului de un „obiect" prea mare pentru a fi înglobat; 5) alterarea distribuției și funcției microfilamentelor consecutivă acțiunii unor anumiți agenți asupra celulelor; 6) contactul cu agenți umorali de tipul componenților C3a, C5a, C5, 6, 7 ai sistemului complement.

După Werb și Goldstein (1984), cînd celulele aderente întîlnesc un stimul solubil, ca, de exemplu, componentul C3, fuziunea granulațiilor cu membrana celulară determină eliberarea constituenților de tip lizosomal prin endocitoză inversă, direct în afara celulei, ca și într-o vacuolă fagocitară. Nu se produce fagocitoză și viabilitatea celulelor aderente nu este afectată. Acesta ar fi mecanismul patogenezei leziunilor tisulare în unele boli grave, determinate de depunerea de complexe imune pe suprafața celulelor sau pe structuri extracelulare, cum sînt membranele bazale vasculare.

Omorîrea microorganismelor

Funcția antimicrobiană a neutrofilelor necesită integrarea complexă a capacității de fagocitoză cu mecanismele microbicide și cu digestia intracelulară, fiecare determinate de o „mașinărie" celulară și de căi metabolice distincte. Deși mult studiate, mecanismele activității bactericide sînt încă puțin cunoscute. Este evident că sistemul antimicrobian predominant variază cu specia organismului-gazdă și a microorganismului, ca și cu disponibilitatea O_2 (Klebanoff, 1975). Pe această bază au fost descrise două mari sisteme de activitate antimicrobiană, în funcție de dependența sau de independența lor față de oxigen.

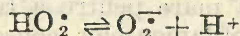
Sistemele antimicrobiene dependente de O_2. Actul fizic al înglobării microorganismelor de către neutrofile nu este dependent de O_2, dar evenimentele care duc la moartea lor sînt cel puțin în parte legate de „cascada metabolică". Dovada o constituie faptul că activitatea microbicidă este scăzută la bolnavi cu metabolismul oxidativ deficitar (Klebanoff, 1975, 1980).

Există două tipuri majore de sisteme antimicrobiene dependente de O_2, în funcție de asocierea lor cu mieloperoxidaza sau de activitatea independentă de aceasta :

Sistemul antimicrobian dependent de mieloperoxidază. Mieloperoxidaza (MPO) (sin. verdoperoxidaza sau neutrofilperoxidaza) este o proteină foarte bazică, cu g.m. 150 000 dal, care conține două grupări hem prostetice/moleculă. Prezentă în granulațiile azurofile (primare), ea formează ~ 5% din greutatea uscată a neutrofilelor.

Peroxidul de hidrogen poate fi produs pe mai multe căi :

1) În cursul metabolismului leucocitar, după ingestia bacteriilor, „cascada" metabolică este asociată cu un consum mărit de O_2. Interacțiunile ce au loc la suprafața celulei, care preced și însoțesc digestia, convertesc cel puțin o parte din O_2 consumat la H_2O_2. Aceasta se formează fie direct, prin reducere divalentă, fie prin formarea intermediară de anion superoxid ($O_2^{\bullet-}$), urmată de dismutarea acestuia, sub acțiunea superoxid dismutazei (Fridovitch, 1971) sau a hidroperoxidului ($HO_2^{\bullet}$), după reacțiile :



$$HO_2^{\bullet} \rightleftharpoons O_2^{\bullet-} + H^+$$



$$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

2) În cursul metabolismului unor microorganisme, ca *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, prin oxidările terminale catalizate de flavoproteine, care reduc O_2 la H_2O_2. Deoarece aceste microorganisme nu au catalaze, H_2O_2 se acumulează, putînd fi toxică pentru microorganismul producător (autoinhibare) sau pentru alte specii, fiind folosită în activitatea sistemului MPO. Există o corelaţie între producerea de H_2O_2 şi absenţa catalazei, pe de o parte, şi sensibilitatea microorganismelor, pe de altă parte, la omorîrea lor de către leucocitele defective (incapabile să producă H_2O_2).

Halogenii: Clorul este prezent în neutrofile în cantităţi considerabil mai mari decît sînt necesare sistemului MPO. El intră în vacuolele fagocitare odată cu particulele sau este transportat prin membrana fagolizosomului.

Iodul este luat fie direct din ser, unde se găseşte în concentraţie de ~ 1 μg/dL, fie prin deiodarea neutrofilelor. El este mult mai activ, deoarece ar produce iodarea proteinelor bacteriene (prin înlocuirea atomilor de H cu atomi de I) în localizări cu importanţă crucială *pe* sau *în* celula bacteriană. Sînt în mod deosebit susceptibili la iodare aminoacizii tirozină şi histidină. De asemenea, sînt intens bactericizi produşii rezultaţi din oxidarea iodului.

In vitro au fost evidenţiate şi alte mecanisme prin care halogenii pot omorî bacteriile, ca, de exemplu, halogenarea peretelui celular, decarboxilarea aminoacizilor cu eliberare de aldehide toxice, producerea de O singlet etc. Nu se ştie dacă ele sînt operative şi *in vivo*, deşi, în general, există o corelaţie între halogenarea peretelui celular şi moartea bacteriilor.

Mecanismul de acţiune a sistemului microbicid asociat cu MPO. Mieloperoxidaza este eliberată în cursul degranulării în vacuolele fagocitare pentru ca în asociere cu H_2O_2 şi cu un halogen (Cl^-, I^-, Br^-), la pH acid, să formeze în fagolizosom un sistem microbicid foarte activ. El omoară bacteriile şi fungii şi inactivează virusurile la o concentraţie de H_2O_2 de 10 μmol/L; în absenţa MPO, un nivel similar este atins doar cu 0,5 mmol/L de H_2O_2. Acţiunea bactericidă s-ar datora capacităţii MPO de a lega H_2O_2 şi halogenii pe suprafaţa celulelor-ţintă, menţinînd componenţii sistemului în strîns contact cu învelişul celular (fig. 80).

Din aceste date rezultă că MPO este indispensabilă sistemului. Ea catalizează formarea HOCl de la Cl^- şi H_2O_2, la pH acid. HOCl format reacţionează cu un aminoacid din peretele bacterian, producînd cloramină instabilă, care produce aldehida respectivă, bactericidă (Sbarra, 1972).

După McRipley şi Sbarra (1967), spre deosebire de alţi autori, sistemul cel mai activ *in vitro* — MPO — H_2O_2 — iodură (I^-) — ar fi inoperant *in vivo*, deoarece concentraţia activă nu este întîlnită în organism decît în tiroidă şi în glandele salivare. Creşterea concentraţiei de iod seric şi celular, ca şi aportul de ser bogat în proteine iodate nu măresc activitatea bactericidă a neutrofilelor normale (Souillet, 1974).

După Klebanoff (1975, 1980), toxicitatea sistemului MPO — H_2O_2 — halogen s-ar datora și altor produși adiționali înalt reactivi, ca acidul hipoiodos (HOI), acidul hipocloros (HOCl), Cl_2 sau ionii instabili de Cl^+ și I^+, greu de obținut *in vitro*.

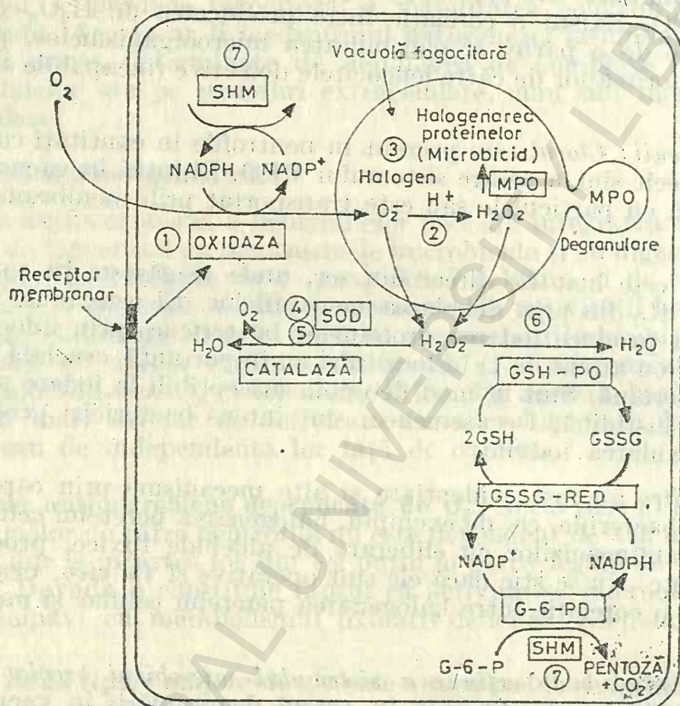
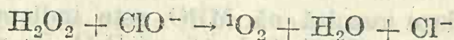


Fig. 80. — Reprezentare schematică a evenimentelor asociate cu omorîrea microorganismelor în prezența oxigenului; SHM — shunt-ul hexozomonofosfaților; MPO — mieloperoxidază; SOD — superoxid dismutază; GSH-PO — glutation peroxidază; GSSG — glutation oxidat; G-6-PD — glucozo-6-fosfat dehidrogenază; G-6-P — glucozo-6-fosfat (după Root, 1981).

Ceva mai mult, sistemul are capacitatea de a mări gama agenților intens bactericizi prin producerea de oxigen singlet, după reacția:



$$H_2O_2 + ClO^- \rightarrow {}^1O_2 + H_2O + Cl^-$$

Sistemul microbicid independent de mieloperoxidază. Organismele cu neutrofile lipsite de MPO (reprezentînd o mică proporție, ~0,025%, din populația generală) nu prezintă predispoziție la infecții, ceea ce demonstrează existența unor sisteme alternative de apărare. Sistemul independent de MPO își datorează eficiența intervenției unor agenți ca H_2O_2, anionul superoxid, radicalul hidroxil și oxigenul singlet. Acțiunea lor bactericidă este mai lentă, necesitînd 3—4 ore pentru a omorî *Staphylococcus aureus* și *Serratia marcescens*. În condiții similare, neutrofilele normale realizează acest efect în 30—45 de minute. Elementele acestui sistem sînt mai active în neutrofilele fără MPO decît în cele normale (Klebanoff, 1975).

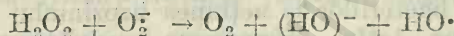
Anionul superoxid. Contactul neutrofilelor cu particulele fagocitate activează sistemul de enzime flavinice asociate cu membrana plasmatică NADH- și NADPH-oxidazele, care catalizează reducerea univalentă a oxigenului, ducînd la formarea de anion superoxid ($O_2^{\cdot}$) și de radical hidroperoxi ($HO_2^{\cdot}$). Superoxidul acționează fie ca reducător, fiind oxidat la oxigen, fie ca oxidant, în care caz este redus la H_2O_2, în prezența superoxid dismutazei :



$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Superoxidul acționează fie direct, fie prin intermediul H_2O_2. După Goldstein (1984), producerea de superoxid ar avea loc pe suprafața externă a membranei plasmatice și a vacuolelor fagocitare formate prin invaginarea ei. Acest mecanism permite concentrarea lui în vacuolele fagocitare și furnizează, totodată, o explicație pentru prezența extracelulară a acestui radical foarte reactiv în stare liberă. Prin conversia la H_2O_2, radicalul superoxid extracelular sau intrafagosomal poate media toate evenimentele biochimice care, final, duc la moartea microorganismelor. În același timp, neutrofilele sînt protejate de efectele lui nocive prin prezența unei cantități importante de superoxid dismutază în citosol.

Radicalul hidroxil ($HO^{\cdot}$), foarte reactiv, este produs, de regulă, prin interacțiunea dintre H_2O_2 și anionul superoxid, după reacția :



$$H_2O_2 + O_2^{\cdot} \rightarrow O_2 + (HO)^- + HO^{\cdot}$$

Este foarte instabil și oxidează puternic substanțele organice.

Oxigenul singlet poate fi produs în cursul „cascadei" respiratorii pe următoarele căi :

1) prin reacția Haber—Weiss, catalizată de fier și de lactoferină :



$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow {}^1O_2 + HO^{\cdot} + (HO)^-$$

2) prin dismutarea spontană a anionului superoxid (în absența superoxid dismutazei) :



$$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow {}^1O_2 + H_2O_2$$

3) prin acțiunea ClO^-, produs în prezența MPO :



$$ClO^- + H_2O_2 \rightarrow {}^1O_2 + Cl^- + H_2O$$

În afara stării fundamentale și a celei de triplet, molecula de oxigen poate prezenta și o stare singlet mai bogată în energie. Starea singlet se formează din oxigen în stare triplet prin absorbție de energie radiantă, în urma unor reacții chimice sau prin transfer de energie de la unele molecule organice (sensibilizatori fotochimici).

Starea singlet are o durată de viață scurtă, în cursul căreia energia este disipată prin degradare termică, emisie de lumină sau prin reacții chimice, cu revenire la starea triplet. Oxigenul singlet este mai reactiv decît oxigenul triplet și reacționează cu diferite substanțe organice care conțin duble legături, fiind letal pentru orice sistem biologic.

Oxigenul singlet este o formă superioară energetic, cu durată de viață scurtă, în cursul căreia energia este disipată nu numai prin degradare ter-

mică, ci şi prin emisie de lumină sau prin reacţii chimice. El are o capacitate deosebită de a reacţiona cu substanţe organice care conţin duble legături, fiind letal pentru orice sistem biologic. Este răspunzător de fenomenele de chemiluminescenţă ale neutrofilelor, care au înglobat microorganisme. Oxigenul singlet este foarte instabil şi se combină cu constituenţii celulelor bacteriene sau cu cei intralizosomali pentru a forma grupări carboxil, electronic instabile. Cînd aceste grupări revin la starea lor de bază, neutrofilele emit mici cantităţi de radiaţii electromagnetice, care pot fi detectate sub formă de lumină, cu ajutorul tuburilor sensibile fotomultiplicatoare („Liquid scintillation counters"). Depistarea fenomenului de chemoluminescenţă stă la baza unui test important de estimare a funcţiei neutrofilelor.

Sistemele antimicrobiene independente de O_2 implică participarea lizozimului, lactoferinei, proteinelor cationice şi histonelor nucleare.

Lizozimul (muramidaza, N-acetil-muramid glicanhidrolaza) este o proteină bazică (punct izoelectric la pH 10,5—11,0), prezentă în concentraţie mare în neutrofilele umane (7 μg în 10^7 neutrofile). El degradează structura de rezistenţă a peretelui celular bacterian, prin ruperea legăturilor β1—4 ale acizilor N-acetil-muramic şi N-acetil-glucozaminic, favorizînd liza bacteriilor.

Sensibilitatea bacteriilor la acţiunea lizozimului depinde de structura peretelui celular. Astfel, *Micrococcus lysodeikticus*, la care ~ jumătate din resturile de acid muramic sînt substituite, este foarte sensibil, în timp ce la *Staphylococcus*, la care toate resturile sînt substituite, sensibilitatea este mai mică. La unele microorganisme se adaugă acţiunea protectoare a membranei externe a peretelui celular.

Lactoferina este o proteină care leagă Fe. Ea este prezentă în granulaţiile specifice şi este probabil descărcată în vacuola fagocitară, unde este microbiostatică cînd este saturată cu Fe. Efectul său antibacterian s-ar realiza prin chelarea Fe, necesar pentru creşterea microorganismelor. După Klebanoff (1975), 1/3—3/4 din lactoferina prezentă în leucocite ar fi descărcată extracelular, în cursul fagocitozei, exercitînd o serie de efecte în mediu. Între altele, lactoferina ar stimula formarea de HO• , furnizînd Fe în stare activă.

Microorganismele se apără de efectul lactoferinei prin producerea de enterocheline (siderofori, feromine), care competiţionează cu ea pentru Fe.

Proteinele cationice, numite iniţial fagocitină, leukine etc., sînt substanţe bogate în arginină, active la pH neutru. După Drutz şi Mills (1984), ele ar afecta capacitatea de diviziune a microorganismelor, în timp ce Klebanoff (1980) consideră că şi-ar exercita toxicitatea prin legarea de membrana externă a peretelui celular bacterian şi prin mărirea permeabilităţii acestuia.

Histonele nucleare ar fi eliberate în mediu după liza şi moartea celulelor, exercitînd un efect bactericid direct.

Proteinazele active la pH neutru, de tipul catepsinei G, elastazelor, serinesterazelor sintetizate de neutrofile, îşi adaugă efectul, mărind astfel eficienţa sistemului.

Analiza comparativă a eficienței diferitelor sisteme celulare antimicrobiene demonstrează rolul esențial al sistemului mediat de MPO. Practic nici un microorganism nu rezistă acțiunii acestuia. Pe de altă parte, se constată că potențialul microbicid al neutrofilelor este în exces față de necesitățile lor în diferite circumstanțe. Această redundanță este reflectată atît la nivelul activităților individuale, cît și prin varietatea lor. Microorganismele infectante sînt, de regulă, sensibile la mai multe sisteme în așa fel încît, dacă un sistem este absent sau deficitar, celelalte îl pot suplini. Ca urmare, un microorganism care în mod normal este omorît de sistemul MPO poate fi distrus, în lipsa acestuia (mai lent, dar eficient), de alt sistem dependent de O_2. Cînd metabolismul oxidativ este deficitar și lipsesc ambele sisteme dependente de O_2 (atît sistemul MPO, cît și cel neenzimatic), creșterea și multiplicarea agentului patogen pot fi împiedicate de intrarea în acțiune a sistemului independent de O_2.

Teste pentru determinarea capacității de omorîre intracelulară a microorganismelor fagocitate

Capacitatea de omorîre a bacteriilor fagocitate este o proprietate foarte importantă din punct de vedere practic, deoarece evidențiază și particularitățile funcționării tuturor etapelor anterioare ale procesului de fagocitoză.

Testarea capacității microbicide a neutrofilelor se face determinînd numărul bacteriilor supraviețuitoare (capabile să inducă formarea de colonii), comparativ cu aceea a neutrofilelor provenite de la un organism martor sănătos. Se utilizează, ca tulpini-test, *Staphylococcus aureus* sau *Serratia marcescens*, care sînt menținute in contact cu neutrofilele, *in vitro*, 30, 60 și 180 minute. După 30 minute se observă o reducere rapidă de ~ 40—50 %, iar după 180 minute supraviețuiesc numai maximum 10 %.

Într-o variantă mai semnificativă, se determină practic numai numărul bacteriilor intracelulare supraviețuitoare, după un contact de 30, 60 și 120 minute între neutrofile, o cultură de stafilococ-test (în proporție de 5 celule bacteriene/neutrofil) și opsonine (amestec în părți egal de ser sanguin, păstrat prin congelare la —70°C, și ser proaspăt). După omorîrea bacteriilor extracelulare cu un antibiotic, neutrofilele sînt lizate în apă sterilă. Numărul bacteriilor intracelulare viabile se determină prin dispersarea unor diluții în serie pe suprafața mediului de cultură. Rezultatele se citesc după 1, 2 și 3 ore de incubare la 37°C. Testul a fost efectuat la un om normal, la un bolnav cu granulomatoză cronică și la un purtător heterozigot al acestei boli ereditare. S-a evidențiat scăderea masivă a numărului bacteriilor intraleucocitare viabile la omul normal, păstrarea viabilității lor la bolnavi și o situație intermediară la purtătorii heterozigoți (Stites, 1984).

Testul de reducere a nitrotetrazoliului. Neutrofilele care ingeră diferitele particule au capacitatea de a reduce tetrazoliul (compus galben, hidrosolubil) la formazan (albastru intens). Colorantul poate fi ușor dozat fotometric după extracție din neutrofile cu solvenți organici.

Mecanismul reacției nu este cunoscut, dar este evident corelat cu modificările metabolice caracteristice neutrofilelor activate (intensifi-

care a shunt-ului hexozomonofosfaților, a consumului de O_2, a producerii de H_2O_2 și de radical superoxid). Ca și testul de chemoluminescență, el exteriorizează astfel integritatea metabolică globală a neutrofilelor care fagocitează (Stites, 1984).

Deficiențele activității bactericide sînt rare și, în general, incurabile. Ele se manifestă prin prezența unor infecții recurente frecvente, mai ales la copii, adesea fără un suport anatomic, localizate în piele, căile respiratorii, sinusuri etc.

Condiția patologică cea mai cunoscută este granulomatoza cronică, boală legată de cromosomul X sau autosomal recesivă, care apare în prima sau a doua lună de viață, sub forma unui sindrom recurent, cu infecții purulente ale pielii, ganglionilor limfatici, pulmonului, ficatului etc. Neutrofilele bolnavilor ingeră normal bacteriile, dar nu le pot omorî, deoarece nu convertesc oxigenul la metaboliți microbicizi (nu produc anionul superoxid, H_2O_2, radicali hidroxil și nici oxigen singlet) (Forehand și Johnston, 1985).

Tulburarea moleculară de bază este legată de NADPH-oxidaza răspunzătoare de conversia oxigenului la compuși bactericizi și poate avea cauze diferite: 1) absența sau disfuncția enzimei care transferă electronii de la NADPH la oxigen, pentru a forma anionul superoxid; 2) absența citocromului b_{245}, component al sistemului oxidazei; 3) lipsa principalului donator de electroni (NADPH) sau 4) scăderea afinității enzimei pentru NADPH (Forehand și Johnston, 1985).

Tulburări ale funcției de omorîre au mai fost semnalate și la bolnavi cu deficiențe în producerea glucozo-6-fosfat dehidrogenazei, enzimă esențială a shunt-ului hexozomonofosfaților și deci a „cascadei" respiratorii, în producerea de mieloperoxidază, în deficiența fosfatazei alcaline sau piruvat kinazei, în absența granulațiilor specifice, în unele leucemii și infecții virale, ca și în sindromul Chediak-Higashi. În acest ultim caz se observă incapacitatea granulațiilor de a fuziona cu fagosomii, ceea ce reduce considerabil proprietățile bactericide ale neutrofilelor.

SISTEMUL LIMFOID – LIMFOCITELE T ȘI B

„Limfocitul, o biată celulă caracterizată în special prin atribute negative..."

O. TROWELL, 1958

„Limfocitele mici, spectatori nepăsători, care urmăresc activitățile furtunoase ale fagocitelor"...

A. RICH, 1960

„Limfocitul a fost un element fundamental în cotitura făcută de natură în cursul evoluției. Fără el, probabil că n-ar mai fi existat ființe superioare pe planeta noastră".

B. HALPERN, 1969

„Limfocitul mic este comandantul șef al strategiei imunologice. Identificat cu personalitatea imunologică a individului, el deține codul structurilor care ne sînt proprii și deci tabu și al celor care ne sînt străine și cu care trebuie să luptăm".

W. L. BOURLAN, 1974

SISTEMUL LIMFOID — LIMFOCITELE T ȘI B

„Limfocitul, o biată celulă caracterizată în special prin atribute negative..."

O. TROWELL, 1958

„Limfocitele mici, spectatori nepăsători care urmăresc activitățile rutinoase ale fagocitelor"

A. RICH, 1960

„Limfocitul a fost un element fundamental în cadrul luptei de natură în cursul evoluției. Fără el, probabil că n-ar mai fi existat ființe superioare pe planeta noastră".

B. HALPERN, 1969

„Limfocitul mic este comandantul șef al strategiei imunologice. Identificat cu personalitatea imunologică a individului, el deține codul structurilor care ne sînt proprii și deci tabu și al celor care ne sînt străine și cu care trebuie să luptăm".

W. L. BOURLAN, 1974

Organele limfoide

(Pl. 13–15)

Limfocitele, celulele esenţiale efectoare ale răspunsului imun, sînt produse, stocate şi „educate" la nivelul organelor limfoide specializate.

Ţesutul limfoid este alcătuit dintr-un reticul fibrilar în ale cărui „ochiuri" se găsesc celulele libere. Reticulul este format din fibre reticulare, celule reticulare şi macrofage fixe, iar celulele libere, în marea lor majoritate limfocite în diferite stadii de diferenţiere şi maturare, includ, de asemenea, plasmocite şi macrofage. Au fost descrise două tipuri de ţesut limfoid : 1) *tipul lax*, în care predomină celulele reticulare, şi 2) *tipul dens*, în care predomină limfocitele, capabile să se organizeze în formaţiuni de tipul nodulilor şi foliculilor limfoizi.

Din punct de vedere funcţional, ţesutul limfoid este concentrat în două tipuri de organe :

1) *Organele limfoide primare*, care apar iniţial în evoluţia filogenetică şi în embriogeneză, sînt reprezentate de timus pentru limfocitele T şi respectiv bursa lui Fabricius (la păsări) şi echivalenţii ei la mamifere pentru limfocitele B. Ele au fost denumite şi organe limfoide centrale, pe baza importanţei lor în producerea şi diferenţierea celor două tipuri de limfocite.

2) *Organele limfoide secundare* sau *periferice* sînt reprezentate de ganglionii limfatici, splină, plăcile Peyer, apendice, amigdale, vegetaţiile adenoide, foliculii difuzi din diferite submucoase. Ele sînt colonizate de celule diferenţiate în organele centrale, care ocupă la nivelul lor teritorii specifice denumite *zone timus-dependente* (populate de celule T) şi *zone timus-independente* (pentru celulele B). Organele limfoide secundare beneficiază de o vastă reţea fină şi complicată de vase sanguine şi/sau limfatice, ce creează posibilitatea întîlnirii limfocitelor cu antigenele pătrunse în organism, circulaţia internă, recircularea celulelor sistemului imunitar şi reîntoarcerea lor în teritoriile specifice (fenomenul de „homing"). Ele asigură posibilitatea de diferenţiere în continuare şi de maturare a limfocitelor, sub influenţa stimulilor reprezentaţi de antigen, şi transformarea lor în celule efectoare şi celule cu memorie.

Rolul limfei şi al vaselor limfatice. Vasele limfatice au originea sub forma unei reţele extrem de fine de capilare limfatice, care comunică între ele şi se anastomozează pentru a forma reţele adevărate. Au diametre variabile şi se dezvoltă progresiv în vase limfatice mai mari. Peretele lor este format dintr-un strat unic de celule endoteliale, acoperite la exte-

rior de o rețea fibrilară, laxă. Spre deosebire de capilarele sanguine, nu au membrană bazală, ceea ce explică, probabil, capacitatea lor de a permite „absorbția" macromoleculelor prezente în lichidul interstițial și în exsudatele inflamatorii.

Limfa rezultă din lichidul interstițial care trece prin peretele capilarelor limfatice pentru a fi dirijat spre ganglioni. Ea străbate interstițiile „pîslei" de celule și fibre reticulare, percolînd printre numeroasele celule implicate în răspunsul imun (limfocite T, B, macrofage, celule dendritice etc.), venind în contact intim cu substanțele și particulele străine. Final, după trecerea prin organele limfoide limfa, este vehiculată prin canalul toracic în circulația venoasă.

Organele limfoide primare (centrale)

Sînt reprezentate de timus și bursa lui Fabricius (la păsări) și echivalenții acesteia la mamifere. Au următoarele particularități generale:

1) Sînt organe limfoide care apar timpuriu în cursul dezvoltării embrionare a animalelor.

2) Reprezintă centre de formare, diferențiere și diseminare în organism a limfocitelor specializate, T și B.

3) Limfopoeza la nivelul lor pornește de la celule-stem pluripotențiale și este independentă de stimularea antigenică. Se manifestă intens înainte de naștere, cînd animalul nu este expus la antigene, ca și la animalele axenice,

4) Extirparea lor determină deficiențe ale răspunsului imun cu atît mai grave cu cît este efectuată mai timpuriu. Efectuată înainte de apariția limfocitelor imunocompetente, determină suprimarea funcțiilor imunitare specifice. Extirparea tardivă, la adulți, nu are efecte grave dacă numărul limfocitelor imunocompetente nu este micșorat de alte cauze (distrugere prin iradiere, vîrstă înaintată, administrarea de ser antilimfocitar etc.).

5) Repopularea lor după iradiere poate fi făcută numai cu celule-stem, nu însă și cu limfocite diferențiate din ganglioni, timus sau bursă.

6) După stimulare cu antigene nu prezintă modificări citologice caracteristice răspunsului imun.

7) Celulele produse migrează în organele limfoide periferice, unde își manifestă activitatea la nivelul unor compartimente funcționale distincte.

Timusul

„Timusul este un organ-cheie al imunității, un fel de șef de orchestră al reacțiilor de apărare".

J. F. Bach

Timusul este un organ limfoepitelial provenit din pungile 3 și 4 faringeale, în urma unor interacțiuni între ectodermul branhial și endo-

derm, ce duc la dezvoltarea unui rudiment timic („thymus anlage") epitelial. Ulterior, mezenchimul, dînd naștere capsulei și septurilor interlobulare, determină lobularea timusului embrionar prin divizarea lobilor în numeroși lobuli și organizarea arhitecturii de ansamblu a organului (Kendall, 1981).

Limfopoeza timică depinde de imigrarea celulelor-stem pluripotente, provenite inițial din sacul vitelin, apoi din ficat, iar la adult exclusiv din măduva oaselor. După Stutman (1979, 1985), celulele din sacul vitelin nu pot migra direct în timus, deoarece au nevoie de o ședere intermediară în ficatul fetal.

Timusul apare în zilele 7—8 la embrionul de găină, în ziua 11 la șoarece (fig. 81). La om, organogeneza timică este terminată după 20 de săptămîni, cînd aspectul microscopic este de timus matur, în timp ce la șoarece este realizată postnatal.

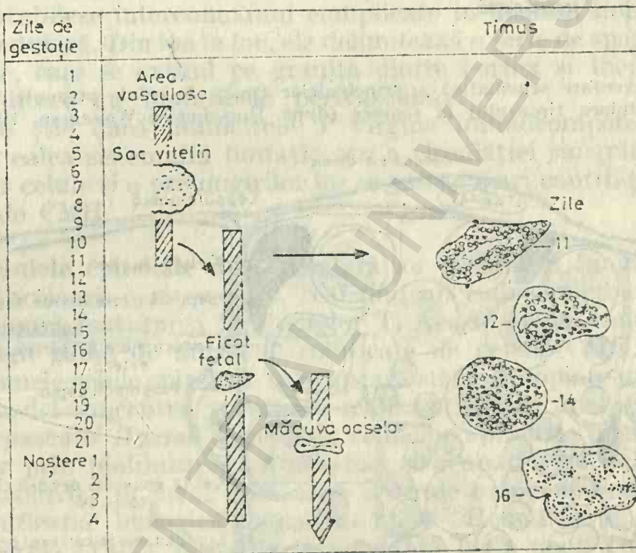


Fig. 81.—Ontogeneza timusului la șoarece (după Owen, 1972).

Structura morfologică de bază este *lobulul timic*, cu dimensiuni variabile (0,5—2 mm). El nu este o unitate anatomic independentă datorită unor zone de continuitate cu lobulii adiacenți. Fiecare lobul are o zonă periferică, numită *cortex*, care conține numeroase limfocite dens împachetate (depășind cu mult numeric celulele epiteliale), și o zonă centrală, *medulara* timică, mai săracă în limfocite și relativ bogată în celule epiteliale (fig. 82).

Pe lîngă limfocite, timusul conține mai multe tipuri de celule nelimfoide, cu rol-cheie în proliferarea, diferențierea și selecția limfocitelor timice în curs de dezvoltare, între care cele mai cunoscute sînt următoarele :

1) **Celulele „doică"** („thymic nurse cells"), descrise de Wekerle și colab. (1980), în timusul de șoarece, sînt celule specializate, localizate în stratul epitelial al cortexului extern (fig. 83).

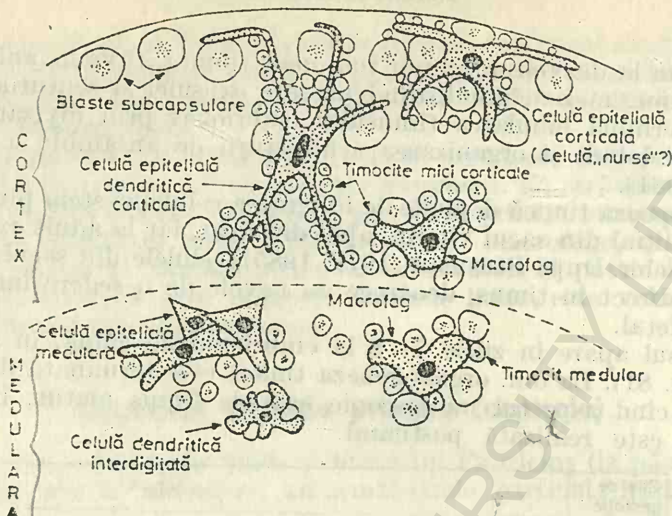


Fig. 82. — Reprezentare schematică a principalelor tipuri de celule prezente în cortexul şi în medulara timusului la şoarece (după Butscher şi Weissman, 1984).

Mastocit extratimic
Capsula timică
Celulă „nurse"
Sept timic care divide lobulii
Cortex extern
Limfocit mare din cortexul extern
Plasmocit septal
Celula epitelială dendritică corticală
Limfocit mic în cortexul profund
Cortex profund
Macrofag
Limfocit mediu medular
Vas sanguin
Medulară
Celulă dendritică interdigitată
Corpuscul Hassal
Celulă epitelială medulară

Fig. 83. — Reprezentare schematică a arhitecturii generale a timusului. Subregiunile timusului sînt prezentate în dreapta figurii, iar constituenţii lor celulari în stînga (după Hood şi colab., 1984).

Greu de evidențiat în timusul intact, ele pot fi eliberate de restul țesutului timic prin tratament energic cu enzime proteolitice. Apar sub forma unor celule mari care exprimă pe suprafață antigene de clasa II CMH și conțin limfocite corticale incluse în vezicule citoplasmatice. După Goldstein și colab. (1984), acestea ar fi timocite, care după eliberare prezintă fenotipul Thy−1$^+$, TLa, Lyt−123$^+$, caracteristic timocitelor corticale. Alți autori consideră că timocitele nu ar fi efectiv incluse în celulele „nurse", „învelirea" lor completă fiind un artefact decurgînd din tehnica de izolare.

Semnificația și originea celulelor „doică" sînt încă nedefinite, deși unii autori le consideră ca avînd origine epitelială și un rol în limfopoeza timică.

2) **Celulele epiteliale dendritice din cortexul profund** formează o rețea complexă datorită numeroaselor prelungiri dendritice foarte ramificate, care stabilesc interconexiuni complicate în drumul limfocitelor spre regiunea medulară. Din loc în loc, ele delimitează o serie de spații ca „lacuri" de limfocite, care se extind pe granița dintre cortex și medulară și sînt conectate direct cu limfaticele perivasculare.

Nu se știe dacă limfocitele T virgine imunocompetente părăsesc timusul pe calea sistemului limfatic sau a circulației sanguine. Pe suprafața acestor celule și a prelungirilor lor se găsesc mari cantități de antigene codificate de CMH.

3) **Celulele epiteliale din medulară** au prelungiri lungi, care interconectate formează o rețea laxă, realizînd un cadru microambiental distinct ce asigură maturarea limfocitelor T. Aceste celule conțin pe suprafață întreaga gamă de antigene codificate de genele CMH. În regiunea medulară, unele celule epiteliale se grupează strîns apropiate unele de altele, după un model concentric, pentru a realiza structuri aproximativ sferice, numite *corpusculii Hassal*. Conversia celulelor epiteliale timice la corpusculi are loc prin hialinizarea citoplasmei și gruparea lor sub forma unor lamele concentrice în jurul unei zone centrale omogene eozinofile.

Semnificația biologică a corpusculilor Hassal este necunoscută. După Piepernik (1977), prezența în structura lor a unor celule cu semne de activitate, a numeroase vilozități și a vascularizării ar pleda pentru o funcție secretorie, endocrină probabil. Pentru Hood și colab. (1984), corpusculii Hassal ar putea reprezenta locul din medulară în care are loc distrugerea limfocitelor care nu s-au maturat corespunzător pentru a deveni imunocompetente. La nivelul lor s-ar găsi, pe lîngă celulele epiteliale medulare, macrofage, și numeroase resturi celulare. Pe măsură ce organismul îmbătrînește, corpusculii timici devin mai mari, putînd lua aspectul unor structuri imense, multiforme, rezultînd din corpusculi fuzionați sau multicentrici.

În timus se mai găsesc în localizări specifice două tipuri de celule dendritice nefagocitare și macrofage.

Celulele dendritice reticulare și cele *interdigitate*, derivate din precursori medulari hematolimfoizi, sînt implicate în prezentarea antigenelor în organele limfoide secundare. Ele contribuie în timus la formarea unei „țesături" laxe în medulară.

Macrofagele sînt repartizate, după Hood și colab. (1984), ca „santinele" de ambele părți ale joncțiunii corticomedulare în centrul curentului de limfocite.

Celulele limfoide din linia T — *timocitele* — reprezintă populația celulară dominantă, localizată în rețeaua complicată formată de prelungirile ramificate ale celulelor epiteliale. Ele sînt mult mai numeroase în cortexul timic decît în regiunea medulară.

Timusul este esențial la începutul vieții pentru a asigura maturitatea imunologică normală a limfocitelor, iar la adulți reaprovizionarea anatomică și funcțională a sistemului de apărare celulară. Celulele epiteliale furnizează seturile diferențiate ale antigenelor CMH, asigurînd „educația" celulelor T, pentru recunoașterea componentelor self, iar unele (nu se știe care) secretă mai mulți hormoni peptidici implicați în maturarea lor.

Involuția timusului

Deși declinul activității sistemului imunitar, corelat cu îmbătrînirea, afectează toate compartimentele sale, cele mai multe date pledează pentru o atingere majoră a celulelor T, cu afectarea funcțiilor helper, citotoxică, a capacității de proliferare ca răspuns la mitogeni, a producerii de IL-2 și a exprimării receptorilor pentru limfokine (fig. 84). Aceste fenomene sînt corelate cu involuția timusului, care începe la om la pubertate, după cît se pare, precedînd declinul funcțiilor timice și al imunității timodependente (A. L. Goldstein și colab., 1984).

Paralel cu această involuție, concentrația hormonilor timici în ser scade (fig. 85). Fenomenul este corelat cu observația că numărul celulelor epiteliale timice care secretă hormoni scade, mai ales după 20 de ani, la om, cînd există o evidentă coincidență între diminuarea volumului timusului și concentrația sanguină a hormonilor. Atrofia, la început mai rapidă, apoi lentă, interesează inițial cortexul, care se îngustează progresiv (cu diminuarea raportului corticomedular) (fig. 84), urmată de infiltrarea parenchimului cu țesut adipos.

Timusul nu dispare complet și asigură organismului producerea redusă de celule T virgine, toată viața. El este prezent și la persoane în vîrstă sub formă de insule de parenchim, sărace în limfocite, în mijlocul țesutului adipos care l-a invadat. Declinul structural și funcțional al timusului s-ar datora acțiunii hormonilor de sex și steroizilor din suprarenale. Celulele din cortex nu produc enzima *20-α-hidroxil-steroid-dehidrogenaza*, implicată în catabolismul steroizilor și, ca urmare, sînt foarte sensibile la prezența acestora în concentrație mărită în circulație (Hood și colab., 1984). Prezența unei activități de tipul celei produse de timozină, la nivel scăzut, chiar la persoane de vîrstă înaintată, s-ar explica fie prin prezența unor celule epiteliale ale timusului endocrin, rămase funcționale, fie prin contribuția unor situsuri de sinteză extratimice. Involuția structurală și funcțională a timusului determină o creștere a sensibilității la infecții, scăderea rezistenței față de tumori, un dezechilibru rezultat din răspunsul crescut față de substanțele self, caracterizat printr-o creștere a frecvenței autoanticorpilor la bătrîni.

Hormonii timici

Timusul are o funcție endocrină certă, materializată prin sinteza unei familii de substanțe polipeptidice, produse de celulele epiteliale și denumite colectiv *hormonii timici*. Prezența lor a fost demonstrată și sub forma unor granule de secreție, evidențiate în celulele epiteliale prin microscopie electronică (J. F. Bach, 1978). După A. L. Goldstein și White (1977),

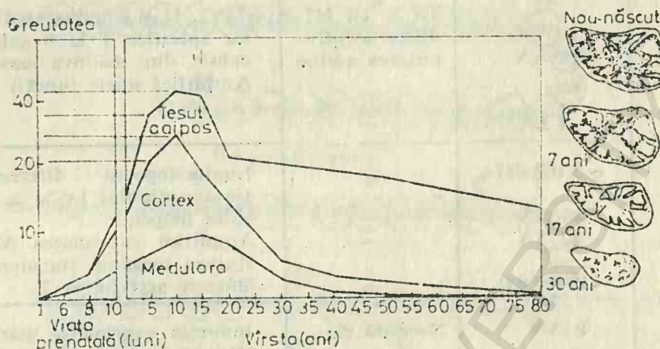


Fig. 84. — Involuția comparată a diferitelor compartimente din timus în raport cu vîrsta la om (după Hammar, 1936).

hormonii timici ar forma o familie de produși cu activități biologice diferite (tabelul nr. 32) și, ca urmare, activi în diferite stadii ale maturării. Hall și A. L. Goldstein (1984) au evidențiat substanțe cu secvență și proprietăți similare în celulele din creier, iar Haynes și colab. (1984), în splină.

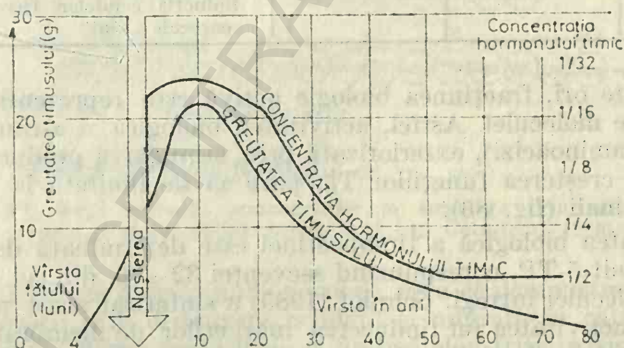


Fig. 85. — Evoluția greutății timusului cu vîrsta la om. După pubertate, greutatea diminuă net, ca și cantitatea de hormon timic, apreciată prin diluția maximă la care poate fi evidențiat în ser (după J. F. Bach, 1978).

Hormonii timici au fost descriși sub denumiri ca: *timostimulina*, *factorul hormonal timic*, *fracțiunea 5 a timozinei*, *factorul timic X*, *timopoetina*, *timulina* etc. (Sztein și A. L. Goldstein, 1986). Uneori, același peptid a fost descris sub denumiri diferite. În alte cazuri, substanțe puțin diferite fizico-chimic (timopectinele I și II) au același efect.

Tabelul nr. 32

Caracteristicile principale şi funcţiile principalilor hormoni timici purificaţi

Denumirea	Nr. aminoacizi şi g.m. (dal)	Particularităţi structurale	Funcţiile
Timopoetine (TP)	~5 562 dal		
TP I TP II TP III	49 AA	TP I, II, III diferă la extremitatea amino	TP I, II şi 5 induc apariţia antigenelor specifice T la o subpopulaţie de celule din măduva oaselor. Amplifică unele funcţii T
TP 5	5 AA		
Timozine	~3 108 dal		Limfocitopoeză şi diferenţiere; inducţia fenotipului Ly-1, 2, 3 şi a funcţiilor helper.
α_1	26 AA	—	
β_4	43 AA	—	Amplifică exprimarea ADN timic şi sinteza terminal transferazei
α_7	~2 500 dal	—	Măreşte activitatea T_S
Timulina	9 AA	Necesită Zn	Inducţia exprimării markerilor T Măreşte funcţiile efectoare Diminuă exprimarea terminal transferazei
Factorul timic umoral	~3 000 dal 31 AA	—	Intensifică maturarea timocitelor la celule T Restabileşte competenţa imunologică *in vivo* şi *in vitro*
Factorul timic seric	~857 dal	—	Inducţia antigenelor specifice pe celule T *in vitro* Inducţia celulelor Thy-1 pozitive la şoarecele „nud"

De multe ori, fracţiunea biologic activă este reprezentată de anumite părţi ale moleculei. Astfel, activitatea biologică a α-timozinei (peptid de 28 de aminoacizi), exteriorizată prin stimularea producerii de IL-2 *in vivo* şi de creşterea funcţiilor T_H, pare să fie limitată la aminoacizii 1—14 N-terminali (fig. 86).

Activitatea biologică a timopoetinei este determinată de un pentapeptid, denumit 5-TP, corespunzînd secvenţei 32—36, din cei 49 de aminoacizi ai moleculei întregi. Schulof (1985) a sintetizat acest pentapeptid, demonstrînd activitatea lui (inducerea markerilor de membrană pe limfocitele T, inducţia selectivă a diferenţierii celulelor T, respectiv transformarea celulelor-stem în celule T imature şi unele efecte secundare asupra transmiterii neuromusculare) *in vivo* şi *in vitro*. Contrar denumirii, nu are efect limfopoetic.

Semnificaţia funcţională a timusului

Producerea de limfocite în timus este mai mare decît în oricare alte organe. Numărul mitozelor la nivelul său este de 5—10 ori mai mare decît în ganglioni sau în plăcile Peyer. El este mai mare în cortex decît

în medulară, maxim la naștere, după care scade cu vîrsta. La șoarece, 1 mg de țesut timic produce ~1 milion de limfocite/zi (Mota, 1986). Cu ajutorul limfocitelor marcate radioactiv s-a ajuns la concluzia că la fiecare 4 zile este înlocuită 95% din populația celulară din organ. Restul de 5% reprezintă celule cu viață lungă. Deși proliferarea celulară este intensă,

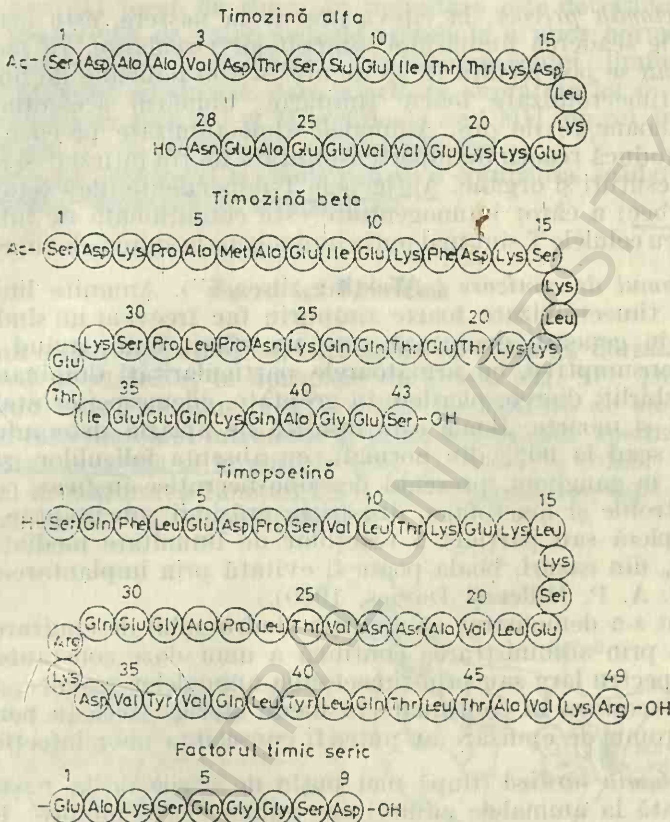


Fig. 86. — Secvența aminoacizilor în structura principalilor hormoni timici (după Sztein și A. L. Goldstein, 1986).

timusul își păstrează dimensiunile normale, ceea ce demonstrează existența unei compensații prin distrugere celulară și migrare în ganglionii limfatici și în splină. Marea majoritate a limfocitelor tritiate sînt distruse *in situ*, numărul celor care migrează fiind foarte mic. După Mota (1986), celulele care migrează în ganglionii limfatici au viață mai lungă, sînt rezistente la cortizon și se localizează în regiuni specifice timodependente. Celulele care migrează în splină au viață scurtă, sînt sensibile la cortizon și se localizează selectiv în pulpa roșie.

Funcțiile biologice ale timusului au fost demonstrate în special prin ablația lui chirurgicală, iradiere etc. Urmările sînt cu atît mai pronunțate și mai grave cu cît suprimarea funcțională este mai timpurie. Archer și Priest (1961), precum și J.F.A.P. Miller au arătat primii rolul fiziologic

al timusului în răspunsul imun. Timectomia la naştere produce o deficienţă importantă, progresivă, a răspunsului imun, care poate fi restabilită, total sau parţial, prin implantarea unui nou timus. Imunodeficienţa este în special gravă la şoarece, la care, la naştere, sistemul imunitar este imatur.

Timectomia precoce, la cîteva ore de la naştere, este urmată după 2—3 luni de scăderea numărului limfocitelor circulante. În mod normal, de la şobolan se pot recolta în 48 de ore ~100 milioane de limfocite. La animalele timectomizate foarte timpuriu, numărul acestora scade la ~3—4 milioane/48 de ore. Animalele timectomizate precoce sînt incapabile să producă reacţii de hipersensibilitate de tip întîrziat şi să respingă grefele de ţesuturi şi organe. Antigenele T-dependente (de exemplu, hematiile de berbec) a căror imunogenitate este condiţionată de interacţiunea celulelor B cu celulele T sînt mai puţin imunogene la animalele timectomizate.

Sindromul de epuizare („Wasting disease"). Anumite linii genetice de animale timectomizate foarte timpuriu fac frecvent un sindrom complex care, în general, evoluează spre un sfîrşit letal, avînd caracterul unei boli consumptive, cu următoarele particularităţi dominante: slăbiciune, păr zbîrlit, diaree, pierdere în greutate, edeme periorbitale, somnolenţă, comă şi moarte. Boala este însoţită de aplazia sistemului limfoid (limfocitele scad la 90% din normal), cu absenţa foliculilor şi centrilor germinativi în ganglioni, prezenţă de zone necrotice în ficat, cu acumulări de neutrofile şi macrofage, dispariţia grăsimii subcutanate şi suprimarea completă sau parţială a reacţiilor de imunitate mediată celular. În 60—80% din cazuri, boala poate fi evitată prin implantarea de ţesut timic (J. F. A. P. Miller şi Davies, 1969).

Recent s-a demonstrat că apariţia sindromului de epuizare poate fi împiedicată prin administrarea continuă a unor doze constante de antibiotice cu spectru larg sau prin timectomia animalelor axenice, urmată de menţinerea acestora în continuare în medii sterile. Aceasta permite ipoteza că sindromul de epuizare ar putea fi consecinţa unor infecţii multiple.

Timectomia tardivă (după mai puţin de 3 zile de la naştere, ca şi cea practicată la animalele adulte) are numai efecte minore. Efectele ei (diminuarea greutăţii organelor limfoide şi a numărului limfocitelor) apar numai după perioade îndelungate: cîteva luni la şoarece şi cîţiva ani la om. După ce şi-au dobîndit imunocompetenţa în timus, celulele T din organele limfoide secundare sînt suficiente pentru a face faţă, în condiţii normale, nevoilor organismului.

Diminuarea numărului limfocitelor indusă de timectomie este limitată la zonele selective de localizare a celulelor T (regiunile timo-dependente): 1) zonele paracorticale ale ganglionilor limfatici; 2) tecile limfatice periarteriolare din splină; 3) ţesutul limfoid difuz din plăcile Peyer.

Grefele de timus restabilesc funcţiile afectate la animalele timectomizate. Regenerarea ţesutului grefat are loc lent. Utilizînd markeri cromosomali s-a demonstrat că în organul grefat proliferează iniţial numai celulele provenite de la organismul-donator. După ~3 săptămîni, celulele proliferante din organ, ca şi cele din organele limfoide secundare au particularităţile limfocitelor organismului receptor. Dacă limfocitele din

timusul grefat au fost distruse în prealabil prin iradiere, faza inițială (proliferarea limfocitelor din timusul grefat) nu mai are loc. Animalul își recuperează starea de imunitate datorită faptului că epiteliile din timusul grefat rezistente la iradiere au rămas funcționale. Dacă a fost iradiat în prealabil și organismul-receptor, grefa de timus se comportă ca o structură epitelială care nu devine niciodată limfoidă.

Rolul esențial jucat de timus în imunitate este determinat de doi factori : 1) producerea de către celulele epiteliale a unor hormoni cu rol în inițierea diferențierii și dobîndirii imunocompetenței limfocitelor T ; 2) rolul macrofagelor dendritice, care poartă pe suprafața lor o mare densitate de antigene de clasele I și II codificate de CMH, cu rol în „învățarea" limfocitelor T să recunoască substanțele self.

Timusul este necesar și la adult pentru a compensa scăderea numărului limfocitelor diferențiate imunologic.

Bursa lui Fabricius

Este un organ limfoepitelial, care apare ca o pungă dorsală pe intestinul terminal al păsărilor, în apropiere de cloacă (fig. 87). Descrisă inițial de Hieronymus Fabricius (1621), a fost considerată de acesta ca un diverticul în care masculul introduce și poate fi păstrată sperma. Harvey (1847) a arătat prezența ei la ambele sexe, iar Glick și colab. (1956) au sugerat rolul în maturarea funcțională a anticorpogenezei, fapt confirmat experimental de M. D. Cooper (1969).

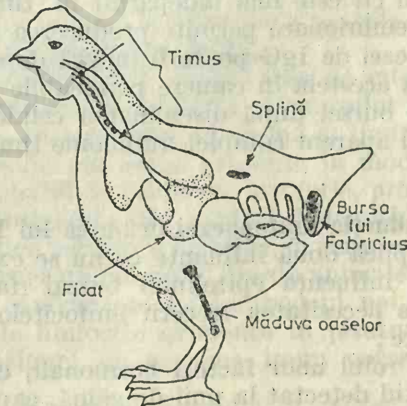


Fig. 87. — Sistemul imunitar al păsărilor este centrat pe două organe limfoide primare, timusul și bursa lui Fabricius. Celulele diferențiate la nivelul lor colonizează ulterior măduva oaselor și splina.

Primordiul bursal apare ca un rudiment epitelial la 4—5 zile de la incubare, de-a lungul zonei de contact ventral-caudal, dintre cloacă și epiteliul extern ectodermal. Epiteliul ei poate fi ectodermal și/sau endodermal. La început pur epitelială, bursa este ulterior populată de celule-stem pluripotente, provenite din sacul vitelin sau din ficatul embrionar. Ele migrează în epiteliul ce delimitează lumenul bursal unde se divid și se diferențiază, pentru a forma focare intraepiteliale de progenitori ai celulelor B. Acestea evoluează pentru a forma foliculi limfoizi circumscriși, care se măresc datorită acumulării de limfocite. Între zilele 13 și 19 de

incubare, bursa embrionului de găină devine limfoidă. După ecloziune, foliculii conţin regiuni corticale, cu limfocite în diviziune rapidă, împachetate dens, şi o regiune medulară, la periferia căreia se găsesc încă celule ce se divid, în timp ce regiunea centrală este populată de limfocite dispersate şi o reţea de celule epiteliale.

Proliferarea rapidă a limfocitelor determină apariţia a cîtorva mii de foliculi limfoizi, fiecare conţinînd ~1 000 de celule B. Celulele B din fiecare folicul bursal par să fie heterogene sub raportul capacităţii lor de a lega antigenele. Deoarece fiecare folicul conţine celule B progene provenite dintr-o singură celulă-stem sau numai din cîteva, este posibil ca o celulă-stem să dea naştere în bursa lui Fabricius mai multor clone diferite de celule B (Zola, 1985).

Bursa lui Fabricius se măreşte rapid în primele 3—4 săptămîni după ecloziune, în corelaţie cu greutatea corporală, atinge dimensiunea maximă la 5—12 săptămîni şi involuează complet în perioada maturităţii sexuale, datorită influenţei hormonilor sexuali.

Rolul bursei a fost demonstrat prin extirparea sa chirurgicală în zilele 16—17 de incubaţie, înainte ca limfocitele B diferenţiate să ajungă în organele limfoide periferice. Ea este urmată de un deficit imun profund, caracterizat prin agamaglobulinemie, lipsa centrilor germinativi şi a plasmocitelor şi prin incapacitatea de a produce anticorpi. Iradierea şi imunosupresia, ca şi „bursectomia hormonală" (prin tratare cu testosteron) reproduc efectele bursectomiei chirurgicale. Eliminarea mai tardivă a bursei determină un deficit în funcţionarea celulelor B, cu atît mai puţin sever cu cît este mai îndepărtat în timp. Astfel, îndepărtarea la 19—21 zile de embrionare permite producerea de IgM, dar nu şi de IgG. Iniţierea sintezei de IgG poate fi indusă de extractele saline de bursă sau prin grefarea acesteia în camere permeabile de tip „Millipore". În cazul îndepărtării bursei după diseminarea celulelor B la periferie, acestea rămîn active şi aparent complet autonome timp de 2—3 ani în absenţa influenţei bursei.

Inducţia limfopoezei în bursa lui Fabricius este un proces complex, care implică două influenţe ce nu se exclud reciproc:

1) influenţa epiteliului bursal (factorul microambiental), demonstrată de necesitatea trecerii limfocitelor B prin mediul epitelial pentru maturare;

2) rolul unor factori hormonali, ca, de exemplu, *bursopoetina*, mic polipeptid detectat la puii de găină, capabil să inducă *in vitro* diferenţierea selectivă a celulelor B.

După Hood şi colab. (1984) nu există suficiente probe pentru a limita diferenţierea celulelor B la păsări numai la bursa lui Fabricius şi pentru a exclude celelalte ţesuturi hematopoetice ca la mamifere.

Migrarea celulelor B. Limfocitele B părăsesc bursa lui Fabricius, intrînd în vasele sanguine care aprovizionează foliculii bursali şi migrează în ţesuturile limfoide începînd din ziua a 16-a de incubare. Acest proces continuă cîteva săptămîni după ecloziune, fapt evident prin mărirea stocului de celule B circulante (Paul, 1984).

Organele limfoide secundare (periferice)

Sînt reprezentate fie de organe anatomic distincte cu structură complexă, fie de structuri limfoide difuze, populate de celule cu origini diferite, între care predomină limfocitele. Ele includ: ganglionii limfatici, splina, plăcile Peyer, țesuturile limfoide asociate cu mucoasele gastrointestinale (GALT) sau respiratorii (BALT), apendicele, vegetațiile adenoide, amigdalele și foliculii limfatici difuzi.

Organele limfoide periferice au următoarele particularități generale (tabelul nr. 33):

1) Au o evoluție limfoidă tardivă și sînt populate de celule limfoide deja diferențiate, provenite din surse primare externe (organele limfoide centrale). Proliferarea și diferențierea în continuare, la nivelul lor, contribuie semnificativ la răspunsul imun.

2) Au o structură analogă și conțin compartimente specializate pentru celulele T (timodependente) și pentru celulele B (timoindependente). Acestea nu sînt delimitate de granițe rigide, permițînd trecerea celor două tipuri de celule de la un compartiment în care sînt predominante, la altul (de Sousa, 1971, 1986);

3) Limfopoeza la nivelul lor este slabă sau inexistentă înainte de naștere. De asemenea, este foarte redusă la animalele axenice, comparativ cu cele normale, chiar după introducerea parenterală a antigenelor.

4) Reprezintă căile prin care limfocitele pot intra din circuitul sanguin. După iradiere, repopularea lor este posibilă cu limfocite diferențiate, în absența celulelor-stem.

5) Extirparea lor totală este imposibilă. Blocarea pe cale chimică, asociată cu splenectomia, diminuă răspunsul imun.

6) Arhitectura lor complicată mărește capacitatea de interacțiune a limfocitelor, necesară pentru inițierea și evoluția răspunsului imun, cu celulele care prezintă antigenele, cu circulația sanguină și limfatică etc.

7) Numărul mare de limfocite periferice prezente în mod normal la nivelul lor este reprezentat probabil de celule cu memorie, produse sub influența diferitelor substanțe antigenice din mediu. Animalele axenice ("germ-free") au țesuturile limfatice periferice atrofice, în timp ce organele limfoide centrale au mărime și structură normale. Aceste animale răspund însă în mod normal dacă sînt confruntate cu imunogeni noi, ceea ce demonstrează că numărul mic de limfocite existente în țesuturile periferice este suficient pentru a asigura un răspuns imun corespunzător (Hansen și Witzgel, 1985).

În concluzie, producerea celor două clase principale de limfocite T și B la nivelul organelor limfoide centrale este urmată de localizarea lor la nivelul organelor periferice. Dacă nu întîlnesc la acest nivel antigenul corespunzător, limfocitele mor. Sub influența unui stimul antigenic însă, ele proliferează și își completează diferențierea la celule efectoare și celule cu memorie.

Nodulii limfoizi

Sînt formațiuni neregulat sferice, cu Ø de 0,2—1 mm, alcătuite din țesut limfoid dens. Sînt prezenți în țesutul conjunctiv al diferitelor organe, în lamina propria a tubului digestiv, a căilor respiratorii și a

Tabelul nr. 33

Principalele deosebiri între organele limfoide primare şi secundare

	Organele limfoide primare	Organele limfoide secundare
Organele	Timusul (la toate vertebratele) Bursa Fabricius (la păsări) şi echivalentul ei la mamifere	Ganglionii limfatici, splina, plăcile Peyer, amigdale, apendice
Embriologie	Zona de trecere între ectoderm şi endoderm	Mezoderm
Dezvoltarea ţesutului limfoid	Timpurie în viaţa embrionară	Tardivă, în viaţa fetală sau după naştere
Durata activităţii	Involuţie la adulţi	Persistă toată viaţa
Activitatea mitotică a celulelor limfoide	Înaltă, independentă de stimularea antigenică	Redusă
Plasmocitopoeza şi producerea de centrii germinativi	Neînsemnată sau absentă, chiar după stimulare antigenică	Prezente în mod caracteristic după stimulare antigenică
Efectele extirpării precoce	Reducerea numărului limfocitelor Limitarea precoce a răspunsului imun, efecte negative importante	Neînsemnate
Efectele extirpării tardive	Reducerea numărului limfocitelor Limitarea tardivă a răspunsului imun (după luni sau ani)	Neînsemnate şi în general fără gravitate

sistemului urinar. Nu sînt structuri permanente, ci pot apărea şi ulterior să dispară într-un anumit loc. Sînt rari la nou-născuţi şi la animalele menţinute în mediu steril. De aceea, se consideră că prezenţa lor ar putea fi determinată de stimuli antigenici locali. Nodulii limfatici prezenţi în organele limfoide secundare sînt numiţi foliculi limfatici.

Ganglionii limfatici

Sînt organe limfoide secundare, reniforme sau rotunjite, izolate sau grupate de-a lungul vaselor limfatice. Prezenţi în formă primitivă la păsări, ganglionii limfatici au dezvoltare maximă la mamifere. La om apar după ~ 11—12 săptămîni de gestaţie (embrion de 50 mm), în regiunile axilară şi iliacă. Sînt acoperiţi de o capsulă netedă şi compartimentaţi de trabecule conjunctive, care divid incomplet spaţiul intracapsular. Parenchimul ganglionar cuprinde trei regiuni distincte : 1) zona corticală superficială (externă); 2) zona paracorticală (cortexul difuz) şi 3) zona profundă, medulară.

Structura de bază este reprezentată de o reţea fină de celule şi fibre reticulare, ce se extinde în tot spaţiul dintre trabecule şi capsulă,

în ochiurile căreia se găsesc limfocite, plasmocite, macrofage, sinusoide limfatice, vase de sînge etc. (fig. 88).

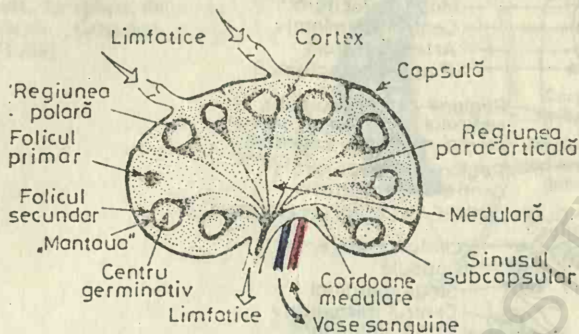


Fig. 88. — Reprezentare schematică a arhitecturii unui ganglion limfatic (după Zola, 1985).

Capsula și parenchimul ganglionar sînt separate printr-un sinus periferic marginal — *sinusul subcapsular* — inserat în pereții fibroși, de la care pornesc *sinusoidele intermediare*. Acestea pătrund în parenchimul cortical și se ramifică în *sinusurile medulare*, separate unele de altele prin *cordoanele medulare*, care se golesc în *căile limfatice eferente*. Sinusul subcapsular nu este un tub, ci o rețea densă prin care poate percola limfa.

Cortexul ganglionilor conține, pe lîngă țesutul reticular, numeroase limfocite strîns grupate, în formațiuni sferice sau ovalare, ce constituie, în ansamblu, *foliculii limfoizi primari*, răspîndiți într-o pătură de limfocite dispersate uniform. Ei au un Ø de ~ 1 mm și conțin limfocite mici. În cursul răspunsului imun se transformă în *foliculi secundari*, caracterizați prin prezența unei zone de proliferare celulară, descrisă în citologie sub denumirea de *centru germinativ* ("germinal center"), adevărați centri de reacție și de producere a anticorpilor. Reprezintă deci o zonă timus-independentă (neafectată de timectomie).

Centrii germinativi sînt sisteme celulare, care apar tranzitoriu în țesuturile limfoide, determinînd, în urma unui stimul antigenic, tranziția de la foliculii primari la foliculii secundari.

Structura de bază este reprezentată de o serie de *celule stromale dendritice*, care prezintă plieri extrem de complicate ale membranei plasmatice, pe care se acumulează (extracelular) mari cantități de antigene. Compartimentul parenchimatos cuprinde două zone distincte și anume, una dens populată și alta în care celulele sînt mai dispersate (zona celulelor rare) (engl. „thinly area") (fig. 89).

Celulele din *zona dens populată* sînt pironinofile, bogate în ribosomi, conțin și secretă Ig (Cogdon, 1969). Cele din *zona puțin populată* sînt asemănătoare, dar sînt mai dispersate, probabil ca rezultat al suprafețelor mari expuse de plierile membranare ale celulelor reticulare din stromă, mult mai abundente în această regiune. De altfel, studiile de marcare

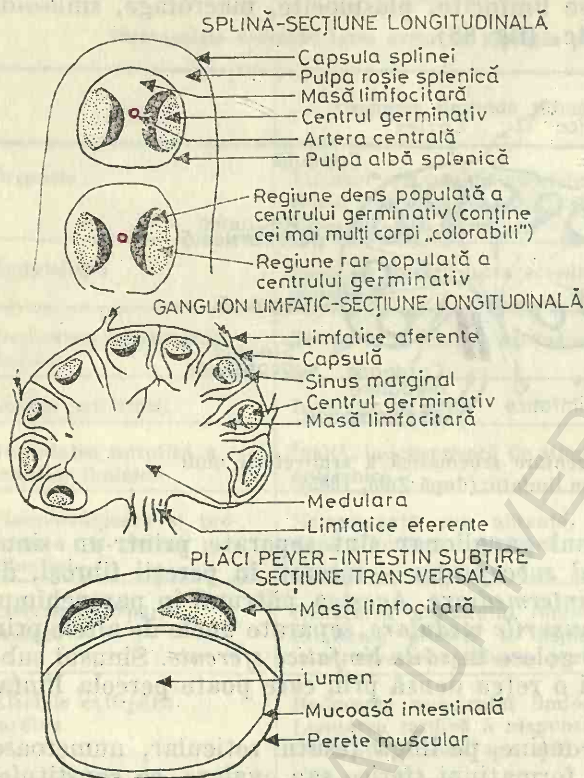


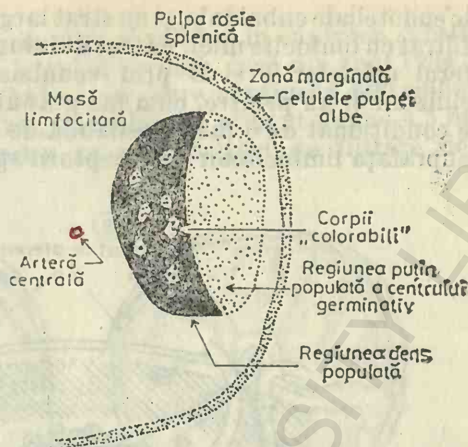
Fig. 89. — Orientarea topografică a centrilor germinativi în anumite ţesuturi limfatice ale şoarecelui (după Congdon, 1969).

radioactivă au demonstrat posibilitatea migrării celulelor din compartimentul dens în cel rar populat şi apoi în masa de celule limfoide înconjurătoare. Cele două zone au o orientare topografică unică, evidenţiată în toate localizările centrilor germinativi : zona celulelor dispersate (mai clară) este dirijată spre sursa de stimulare antigenică (fig. 90) ; zona dens populată conţine un număr de macrofage care fagocitează activ celulele moarte din regiune. Datorită nucleilor şi resturilor celulare înglobate se colorează intens, dînd un aspect caracteristic, denumit *corpi colorabili* (engl. „tingibly" sau „stainable bodies").

În ganglionii limfatici, foliculii secundari sînt situaţi exact subcapsular. Centrii germinativi situaţi mai profund, sub poziţia celor secundari, sînt numiţi *foliculi terţiari*.

Apariţia centrilor germinativi şi gradul lor de dezvoltare sînt în funcţie de intensitatea stimulului antigenic. Cînd stimulul antigenic dispare, activitatea proliferativă a centrilor germinativi scade şi foliculul revine la aspectul de folicul primar, care conţine macrofage cu incluziuni nucleare.

Fig. 90. — Reprezentare schematică a unui centru germinativ și a masei de celule limfocitare înconjurătoare așa cum apar, în mod obișnuit, în splina de șoarece (după Congdon, 1969).



Cortexul difuz sau profund *(regiunea paracorticală)* este o zonă imprecis delimitată, intermediară între zonele corticale și medulare. Situată sub și între foliculii limfatici, este compusă din mase neregulate de țesut limfoid dens. Următoarele date demonstrează că este o regiune timus-dependentă (populată de celule T): 1) este foarte puțin populată la șoarecele „nud"; 2) limfocitele dispar din această regiune după timectomie; 3) este hipertrofiată considerabil după imunizarea cu antigene care induc hipersensibilitate de tip întîrziat.

Regiunea medulară, centrală, conține țesut limfoid dens, distribuit în formațiuni neregulate care apar ca trabecule sau cordoane medulare între care circulă sinusurile medulare. Este o regiune cu o populație celulară mixtă, predominant timus-independentă datorită numărului mare de celule B, asociate însă cu plasmocite, macrofage și celule T, pregătite pentru a migra (fig. 91).

Vascularizarea. Ganglionii limfatici au o dublă vascularizație, limfatică și sanguină. Limfa pătrunde în ganglioni pe calea celor 5—8 vase limfatice aferente, care străbat capsula la nivelul suprafeței convexe, pentru a-și goli conținutul în sinusul marginal subcapsular. De la acesta, pornesc radiar sinusurile corticale, ce trec printre foliculii limfatici corticali și devin sinusuri medulare. Acestea converg spre hil, unde conflueazā pentru a forma limfaticele eferente (vezi fig. 88).

Sinusurile limfatice din ganglioni sînt mărginite de celule, a căror suprafață apicală este neregulată, creînd astfel obstacole pentru scurgerea limfei. Sîngele circulă în direcție opusă celei a limfei, intrînd printr-o arteră situată la nivelul hilului, prin care pătrund ~ 90% din limfocitele care vor părăsi ganglionul. El își continuă drumul prin arteriole, trecînd într-un plex capilar extrem de bogat, pentru ca să ajungă în venulele postcapilare din cortexul difuz. Injectarea i.v. a limfocitelor tritiate la șobolan a arătat că acestea părăsesc sîngele la nivelul venulelor subcapilare (venulele Schulze la om), pentru a se concentra, inițial, în regiunea paracorticală. Venulele au o cavitate centrală foarte mică, determinată de

celulele endoteliale cuboidale, şi un strat larg subendotelial de ţesut conjunctiv, infiltrat cu limfocite mici, ce trec din sînge spre parenchimul ganglionar. Transferul celulelor T şi B prin venulele postcapilare s-ar face prin endoteliile lor şi nu printre, cum fac granulocitele şi macrofagele (fig. 92). El este condiţionat de o fază prealabilă de legare specifică a unor glucide de pe suprafaţa limfocitelor de receptorii specifici ai endoteliului.

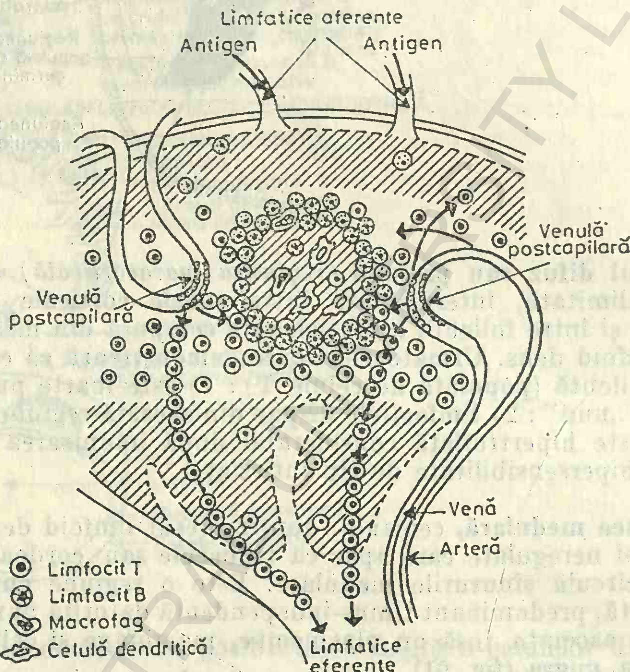


Fig. 91. — Localizarea limfocitelor T şi B în ganglionii limfatici. În alb, regiunea timodependentă; haşurat, regiunea timoindependentă. Celulele T circulă constant, trecînd din venulele postcapilare în parenchimul limfatic, unde intră în contact cu celulele dendritice şi B. Trecînd prin ganglioni, celulele T se localizează preferenţial în regiunea paracorticală (în alb), de unde trec în sinusurile medulare şi apoi în circulaţia limfatică (modificată de Mota, după Cradock, 1986).

După extravazare, limfocitele migrează spre teritoriile specifice, respectiv în foliculii primari în cazul celulelor B şi în cortexul difuz pentru celulele T. După ce străbat lent domeniile specifice corticale extern şi profund (cortexul difuz), celulele T şi B intră în medulară, care serveşte ca regiune de colectare pentru sinusurile ce duc la vasele limfatice eferente, ce vor purta limfa modificată în urma tranzitului prin ganglion.

Circulaţia prin ganglioni permite unui număr mare de limfocite să traverseze localizările specifice, în care pot întîlni substanţele străine imunogene, mărind şansa unui număr mic de limfocite imunocompetente să întîlnească antigenul specific corespunzător şi să reacţioneze cu el.

Funcţia de filtrare a ganglionilor şi rolul ei în captarea substanţelor străine au fost demonstrate de Drinker şi colab. încă din anul 1934. Perfuzînd un ganglion cu 5 ml de bulion-ser, care conţineau 600 milioane de celule de streptococ hemolitic/ml, au izolat din efluent numai 4,5 milioane bacterii/ml, ceea ce corespundea unei capacităţi de filtrare de 99%.

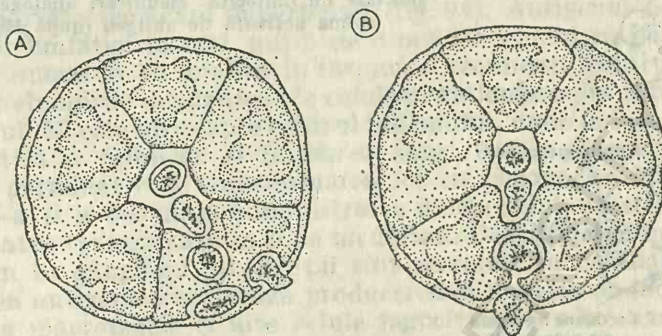


Fig. 92. — Migrarea limfocitelor din venulele postcapilare în ganglioni se poate face traversînd direct celulele endoteliale (A) sau prin infiltrare între două celule adiacente (B).

Ganglionii limfatici sînt structuri dinamice reprezentînd sediul unui flux continuu de celule, de multiplicare considerabilă a limfocitelor şi de inţiere a răspunsului imun.

Modificări structurale în cursul imunizării şi al infecţiilor

Organele limfoide secundare suferă modificări importante în funcţie de natura antigenelor care le stimulează atît sub raportul volumului lor global, cît şi al celui al diferitelor zone, corelate cu schimbări calitative în populaţia celulelor componente. Cel mai mult studiate sînt cele produse în ganglionii limfatici, deşi modificări analoge au fost descrise şi în cazul splinei.

Antigenele pătrund în ganglioni pe calea limfaticelor. Celulele T şi B circulante mature ajung în parenchimul ganglionar prin peretele venulelor postcapilare şi îl părăsesc prin limfaticele eferente, pentru a ajunge din nou în sînge pe calea vaselor limfatice majore.

În cursul *răspunsului imun mediat celular*, indus de o substanţă ca antibioticul oxazilon, care stimulează acest tip de răspuns (Oort şi Turk, 1965), primele modificări se produc după 24 de ore, prin apariţia în cortexul profund a unor celule blastice ce proliferează pînă în ziua a 4-a, determinînd mărirea importantă a volumului acestuia (fig. 93). Venulele postcapilare prezintă, de asemenea, modificări importante încă din primele zile după imunizare : celulele endoteliale devin turgescente şi numeroase limfocite traversează peretele celular. Celulele blastice dispar în ziua a 7-a, după ce au format o populaţie nouă de celule mici. În acelaşi timp, zona corticală şi foliculii sînt numai puţin modificaţi. Modificările descrise nu apar la şoarecii timectomizaţi la naştere, la care nu se

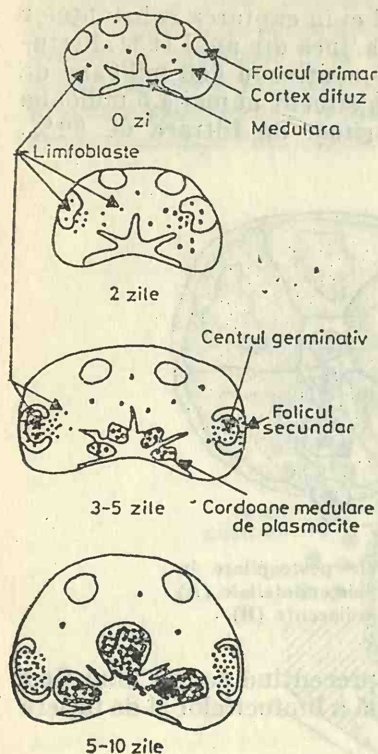


Fig. 93. — Modificări morfologice în ganglionul limfatic, după stimularea antigenică. Schema prezintă evoluţia în timp a modificărilor dependente de antigen la nivelul structurilor multicelulare. De asemenea, sînt reprezentate modificările de mărime şi formă ale diferitelor compartimente limfoide produse, în mare măsură, prin proliferarea selectivă şi căile modificate de deplasare ale diferitelor subclase de limfocite. Modificări analoge au loc şi în splina activată de antigen (după Hood, 1984).

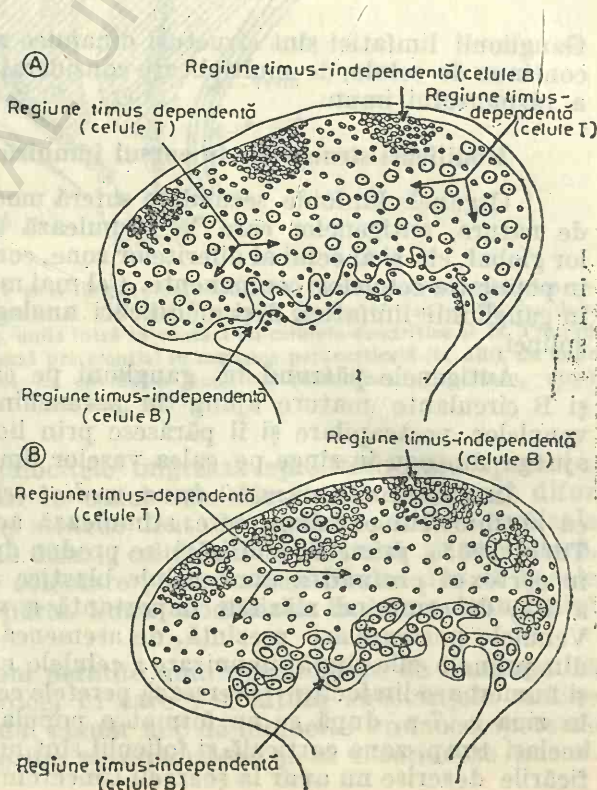


Fig. 94. — Reprezentare schematică a unui ganglion limfatic după stimulare antigenică. A. Evidenţierea modificărilor regiunii T -dependente, după stimulare cu antibioticul oxazilon, care induce intens hipersensibilitate de tip întîrziat şi un răspuns nul sau slab în anticorpi, B. Stimularea cu antigene T-independente (polizaharide de pneumococ sau dextran) evidenţiază transformarea blastică în centrii germinativi şi în cordoanele medulare, care cuprind regiunea B-dependentă (după Good, 1977).

înregistrează proliferări celulare, cortexul profund (difuz) rămînînd sărac în limfocite.

În cursul *răspunsului imun mediat umoral*, reprodus experimental cu ajutorul antigenelor timus-independente (polizaharide de pneumococ, lipopolizaharide de *E. coli*, dextran, flagelină polimerizată etc.), modificările cele mai semnificative apar în zona specifică de localizare a celulelor B (regiunea timus-independentă), care corespunde regiunilor corticale îndepărtate (cortexul superficial) (fig. 94). Antigenul este capturat de foliculii limfatici în mai puțin de o oră (în cursul răspunsului imun primar) și numai în 10 minute în răspunsul secundar, pentru a fi regăsit legat de prelungirile dendritice ale celulelor reticulare din zona marginală a foliculului. El este atras spre centrul foliculului, unde induce proliferarea caracteristică a celulelor și formarea zonei fertile (Piepernik, 1977) a centrului germinativ și transformarea lor în plasmocite imature. Către zilele a 5-a și a 6-a de la administrarea antigenului, acestea devin plasmocite mature și migrează în zona medulară. Deși cele mai multe plasmocite rămîn în ganglioni, anticorpii sînt secretați în circulația generală. Stimularea antigenică activează producerea și secreția de factori solubili, care atrag macrofagele și alte celule fagocitare, produc vasodilatație și liberarea de lichid plasmatic. Aceste modificări complexe, asociate cu reținerea unui număr important de limfocite normal circulante, cu proliferarea lor specifică, cu numărul crescut de celule nelimfoide și cu edemul, determină o mărire importantă a volumului ganglionilor (fig. 93). Ele revin la normal după terminarea infecției sau a răspunsului imun.

Splina

Splina, cea mai mare acumulare de țesut limfoid, acționează ca un filtru masiv interpus pe vasele sanguine, cu rol esențial în imunitate, în reținerea antigenelor străine, a particulelor, a resturilor celulare etc., și de sediu al răspunsului imun. Pe secțiuni apare sub forma unor structuri ~ rotunde, alb-cenușii (pulpa albă), răspîndite pe un fond roșu închis (pulpa roșie). Este acoperită de o capsulă conjunctivă densă, de pe a cărei suprafață internă pornește o rețea ramificată de *trabecule*, care o subdivizează în compartimente intercomunicante, în care se găsesc *pulpa roșie* și *pulpa albă*. În trabecule se găsesc arterele trabeculare, care, după ce ating diametrul de ~ 200 μm, pătrund în parenchimul organului, unde sînt acoperite de o teacă densă de țesut limfoid. Întreaga pulpă splenică este întrețesută cu celule reticulare și fibre reticulare, alcătuite din fibrile asemănătoare colagenului. Deși materialul fibros pare să furnizeze numai un suport inert ca o matrice, suprafața celulelor reticulare este importantă pentru răspunsul imun.

Pulpa roșie, formată anatomic din cordoane splenice și sinusuri venoase, reprezintă cea mai mare parte din parenchimul splenic. Cordoanele splenice sînt formate dintr-o structură de bază (fibre și celule reticulare, macrofage) în „ochiurile" căreia se găsesc toate tipurile de elemente și un număr foarte mare de hematii. Între cordoanele splenice apar sinusurile venoase, care sînt capilare cu diametru neregulat, tapetate de celule care

fagocitează intens antigenele particulate. Fiind locul în care se concentrează cea mai mare parte din sîngele ce pătrunde în splină, conţine, de asemenea, numeroase celule fagocitare şi producătoare de anticorpi. Ea reprezintă sediul în care are loc distrugerea hematiilor uzate.

Zona marginală separă pulpa roşie de pulpa albă. Este bogat irigată, primeşte numeroase arteriole terminale şi reprezintă zona de schimb dintre cele două tipuri de pulpă. Ea este importantă din punct de vedere imunologic, deoarece reprezintă zona în care sînt reţinute cele mai multe antigene provenite din sînge. Antigenele proteice marcate radioactiv sînt regăsite rapid pe suprafaţa prelungirilor citoplasmatice ale celulelor reticulare din această regiune şi numai ulterior în interiorul foliculilor. Sub raport celular, este o zonă mixtă (conţine limfocite T şi B), mai bogată în limfocite şi plasmocite decît pulpa roşie. Limfocitele marcate cu tritiu ajung la nivelul ei în 15—20 minute şi numai după 24 de ore în pulpa albă, la nivelul structurilor periarteriolare.

Pulpa albă are o structură înalt organizată şi este formată din limfocite şi celule înrudite, dispuse în reţeaua de celule şi fibre reticulare pentru a forma teci limfoide periarteriolare şi foliculi limfatici (fig. 95).

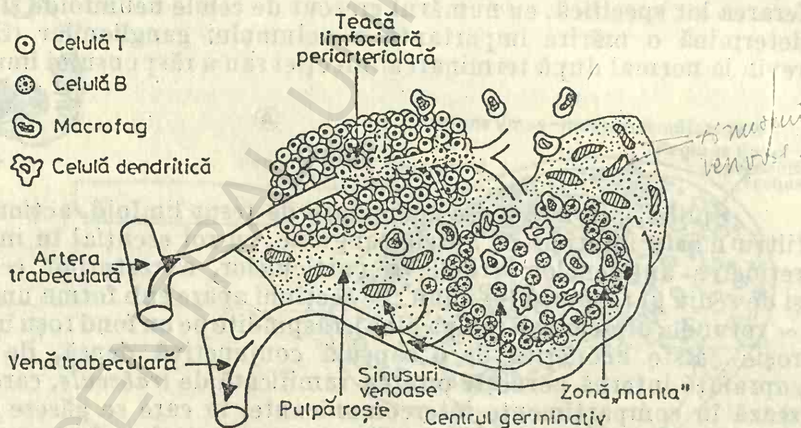


Fig. 95. — Topografia regiunilor timus-dependente (TD) şi timus-independente (TI) în splină. Teaca limfocitară periarteriolară constituie regiunea TD, în timp ce foliculii limfoizi şi ţesutul limfoid adiacent reprezintă zona TI (după Cradock şi colab., 1971).

Tecile limfoide periarteriolare („periarteriolar lymphatic sheaths") sînt manşoane coaxiale de limfocite organizate în jurul arteriolelor centrale foarte ramificate, ramuri ale arterelor trabeculare. Ele conţin o zonă internă bogată în celule T şi una externă (sub zona marginală) bogată, mai ales, în celule B (Piepernik, 1976). După Lamb (1979), tecile sînt formate aproape exclusiv din celule T, în timp ce foliculii sînt în cea mai mare parte formaţi din celule B.

Foliculii limfoizi primari sînt structuri sferice sau ovalare asemănătoare celor din ganglioni. Sînt răspîndiţi din loc în loc *în* sau imediat *în afara* tecilor limfatice periarteriolare, adesea la nivelul bifurcaţiilor arterei centrale sau al ramificaţiilor ei principale. În cursul răspunsului imun, produc foliculi limfatici secundari cu centri germinativi (fig. 96).

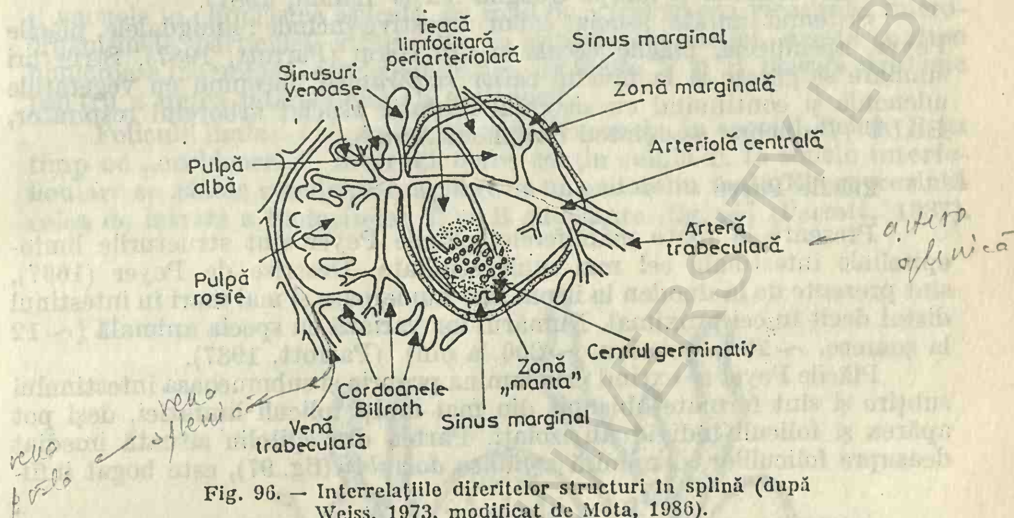


Fig. 96. — Interrelaţiile diferitelor structuri în splină (după Weiss, 1973, modificat de Mota, 1986).

Splina nu are circulaţie limfatică. Spre deosebire de alte organe limfoide secundare, în splină limfocitele intră şi ies direct pe calea circuitului sanguin. Ele pătrund pe calea arterei splenice; aceasta se ramifică pentru a forma arterele trabeculare, intră în pulpa albă, ca arteriole centrale, care formează numeroase ramificaţii şi arteriolele „în perie" („penicillary arterioles"). La nivelul acestora, conţinutul lor este drenat în capilare „poroase" care formează graniţa dintre tecile limfoide periarteriolare şi zona marginală (Lumb, 1979). „Porozitatea" acestor capilare permite elementelor sanguine să fie distribuite prin zona marginală şi în pulpa roşie. Sîngele intră final prin sinusoidele venoase în pulpa roşie, trece prin venele pulpare şi trabeculare pentru ca să ajungă, prin intermediul venei splenice, în vena portă. Limfocitele au nevoie de un interval de ~6 ore pentru a traversa cîmpurile limfoide ale splinei.

Structurile limfoide respiratorii şi intestinale

Mucoasa intestinală conţine un număr mare de celule participante în inducţia şi evoluţia răspunsului imun : macrofage, celule care „prezintă" antigenele, limfocite, plasmocite etc., fie organizate în structuri distincte, fie difuze.

Structurile limfoepiteliale ale intestinului diferă de alte organe limfoide, cum sînt ganglionii, prin lipsa capsulei şi a căilor limfatice aferente. Epiteliul care le acoperă se deosebeşte de restul epiteliului intestinal,

care reprezintă o barieră pentru particule mari, bacterii etc., printr-o porozitate deosebit de mare, ce favorizează pătrunderea antigenelor solubile sau particulate. Lichidul care percolează spre foliculi prin acest epiteliu înlocuieşte funcţia limfei aferente. În cursul trecerii lui, materialul antigenic provenit din lumenul organului este preluat de macrofage şi de foliculii limfoizi (Phillips-Quoglia Ta şi Lamm, 1987).

Sistemul limfatic asociat căilor digestive include : amigdalele, plăcile Peyer, apendicele, plăcile cecale şi din colon (Parrott, 1987). Structuri similare se găsesc şi la nivelul *căilor respiratorii*, începînd cu vegetaţiile adenoide şi continuînd cu sistemul limfatic asociat arborelui respirator, BALT (*B*ronchus *a*ssociated *l*ymphoid *t*issue).

Plăcile Peyer

Prezente la toate mamiferele, plăcile Peyer sînt structurile limfoepiteliale intestinale cel mai mult studiate. Descrise de Peyer (1667), sînt prezente de la duoden la ileon, mai numeroase şi mai mari în intestinul distal decît în cel proximal. Numărul lor variază cu specia animală (~12 la şoarece, ~20 la şobolan, ~200 la om) (Parrott, 1987).

Plăcile Peyer se extind prin lamina propria şi submucoasa intestinului subţire şi sînt formate obişnuit din mai mulţi foliculi limfatici, deşi pot apărea şi foliculi individuali izolaţi. Partea din epiteliu situată imediat deasupra foliculilor, denumită *regiunea domului* (fig. 97), este bogat infil-

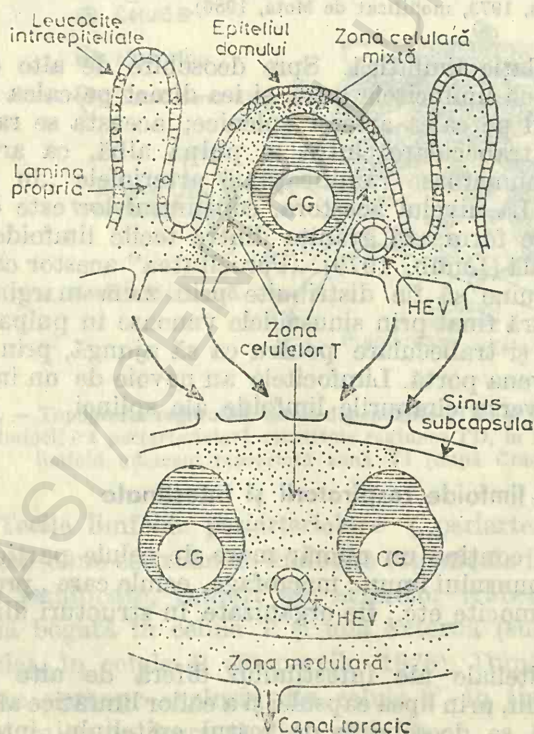


Fig. 97. — Structura schematică a unei plăci Peyer şi a unui ganglion mezenteric: HEV — venule cu endoteliu înalt; CG — centru germinativ (după Parrot, 1987).

trată cu limfocite și se continuă cu cripte și vilozități. Epiteliul domului este mai degrabă cubic decît columnar și conține, în plus, o serie de celule modificate denumite *celule asociate cu foliculii* („follicle associated cells") la șoarece sau *celule M* („microfolds cells") la om. Aceste celule, prevăzute cu scurte microvilozități neregulate, conținînd numeroși tubuli, vezicule și vacuole în citoplasma apicală, au rolul de a transporta virusurile, microorganismele, particulele străine etc. în stratul subepitelial. Acesta conține numeroase macrofage, celule dendritice, limfocite T și B, plasate strategic pentru a putea interacționa cu antigenele.

Foliculii limfatici și centrii germinativi conțin, în special, celule B, în timp ce „coridoarele" interfoliculare conțin celule T. În zonele interfoliculare se găsesc venule postcapilare cu un endoteliu înalt. Ele reprezintă calea de intrare a limfocitelor T și B circulante (fig. 98) (Parrott, 1987).

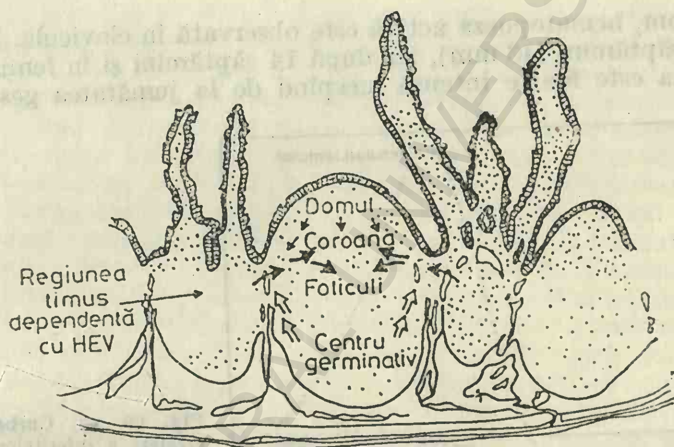


Fig. 98. — Schema unei secțiuni printr-o placă Peyer. Săgețile mici negre indică direcția probabilă de scurgere a lichidelor și a antigenului pe calea epiteliului care acoperă domul spre plexul limfatic ce înconjură nodulul limfatic. Săgețile mari negre arată căile de migrare a limfocitelor din venele cu endoteliu înalt (HEV), localizate în regiunile timus-dependente, prin domul și „coroana" nodulului. Săgețile duble indică direcția probabilă de migrare a celulelor mitotice din centrul germinativ, unde are loc sinteza de ADN, spre plexul limfatic (după Phillips-Quagliata și Lamm, 1987).

Apendicele. Prezent numai la iepure, maimuțe antropoide și om, prezintă structuri limfoide cu organizare similară plăcilor Peyer, avînd un dom bine definit, agregate de celule B organizate în foliculi și o regiune de celule T, plasată „în sandwich" între doi foliculi adiacenți. Epiteliul domului este foarte „poros", permițînd trecerea liberă a antigenelor solubile și a celor particulate, ca și a bacteriilor.

Amigdalele. La om, amigdalele sînt primele organe limfoepiteliale care vin în contact cu materialele ingerate. Suprafața lor externă este acoperită de mai multe straturi de epiteliu, infiltrat cu limfocite. Prezența criptelor care pătrund profund în țesutul amigdalian facilitează interacțiunea conținutului din lumenul lor cu macrofagele și limfocitele.

Măduva oaselor

Deşi nu este un organ limfoid, măduva oaselor are un rol deosebit de important deoarece, la adult, asigură în exclusivitate formarea precursorilor diferitelor populaţii de limfocite. Acest fapt este evidenţiat de capacitatea transplantului de măduvă de a restabili funcţiile sistemului imunitar la rozătoare iradiate, dar netimectomizate.

Apariţia ei este corelată cu consolidarea oaselor, necesară pentru a permite formarea spaţiilor libere, care urmează a fi colonizate de celulele-stem multipotenţiale, provenite din ficatul embrionar. Structura ei este aceea a unui sistem vascular complex, care circulă în mijlocul ţesutului hematopoetic, reprezentat de toate tipurile de celule circulante (hematii, granulocite, mononucleare, megacariocite, limfocite, plasmocite etc.) şi de precursorii lor.

La om, hematopoeza activă este observată în claviculă, la embrioni după 10 săptămîni (43 mm), iar după 14 săptămîni şi în femur (75 mm). Activitatea este foarte intensă începînd de la jumătatea gestaţiei, cînd

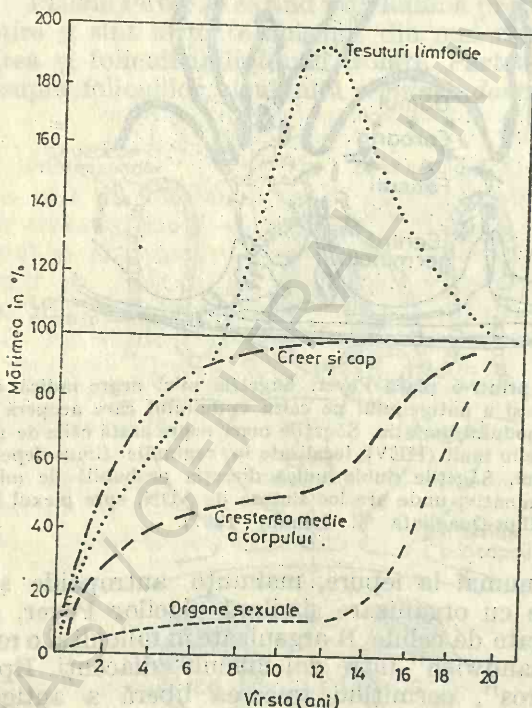


Fig. 99. — Curbele de creştere a diferitelor ţesuturi şi organe comparativ cu dezvoltarea sistemului limfoid (după Solomon, 1971).

începe represia hematolimfopoezei hepatice. La adulţi, această activitate continuă în măduva roşie, răspîndită ubicvitar în toate spaţiile libere ale oaselor, unde are rolul de a reface rezerva de celule sanguine cu viaţă scurtă. Astfel, durata medie a vieţii unui granulocit este de ~7 ore în circulaţie, a hematiilor de ~110 zile, a limfocitelor de la cîteva zile la cîteva luni.

Importanța măduvei oaselor în imunitate este ilustrată și de cîteva date cantitative, chiar dacă au caracter relativ inerent. Bainton (1980) apreciază la ~2 600 g cantitatea de măduvă a oaselor la un adult normal (~4,5% din greutatea corporală). După Metcalf (1985), măduva activă are la omul adult o greutate de 1 200—1 500 g și conține de 100 de ori mai multe celule decît întreaga populație a globului. După Lajtha (1972), la omul adult normal mor în fiecare oră ~10 miliarde de hematii, 20 miliarde de trombocite, 5 miliarde de leucocite. Pentru compensarea acestor pierderi, în cursul vieții unui om de 70 de ani, măduva oaselor produce ~650 kg hematii (6 milioane de miliarde de celule) și ~1 000 kg leucocite (4 milioane de miliarde). Fig. 99 prezintă curba de creștere a țesuturilor limfoide la om, comparativ cu alte țesuturi și organe. Valorile sînt exprimate în procente raportate la datele înregistrate în mod normal la vîrsta de 20 de ani.

Limfocitele

(Pl. 14–22)

„Limfocitul este probabil cea mai interesantă celulă a vertebratelor. Enorma sa heterogenitate, rezultînd din angajarea fiecărei celule de a da expresie numai unui singur tip de specificitate, pentru ca să recunoască un singur antigen, nu este întîlnită la nici o altă celulă. Ea este la baza acestei capacităţi funcţionale uimitoare: diversitatea răspunsului imun."

F. Loor, G. E. Roelants

Limfocitele sînt celule răspîndite practic în tot organismul: constituente principale ale timusului, ganglionilor limfatici, splinei, amigdalelor, apendicelui, plăcilor Peyer, ele se găsesc în număr mare în măduva oaselor, în vasele limfatice şi formează o mare parte din celulele sanguine.

Definite iniţial numai pe criterii morfologice, limfocitele au fost considerate mult timp drept celule terminale, avînd o funcţie enigmatică. Această concepţie a fost restructurată fundamental, după ce s-a demonstrat că acest tip de celule, aflate într-o proporţie considerabilă în stare de repaus, relativ „liniştite" metabolic, pot fi stimulate să prolifereze, să se diferenţieze şi să participe cu un rol esenţial în elaborarea răspunsului imun. Caracterul de celule imunocompetente a fost demonstrat de Medawar (1958), fie direct, prin evidenţierea unor activităţi imunologice specifice, fie indirect, prin tulburările determinate de eliminarea din organism a unora dintre ele. Gowans şi colab. (1964) au confirmat aceste date experimental: scăderea masivă a numărului lor prin cateterismul canalului toracic la şobolani determină scăderea capacităţii de producere a anticorpilor, în timp ce introducerea în organism a unor populaţii pure de limfocite restabileşte această funcţie.

Clasificare şi morfologie. Limfocitele sînt clasificate în mod arbitrar în trei categorii: 1) *limfocitele mici*, cu Ø de 7–8 µm; 2) *limfocitele mijlocii*, cu Ø de > 9 µm, cu citoplasmă mai abundentă conţinînd poliribosomi; 3) *limfocitele mari*, cu Ø de 15–20 µm, înrudite morfologic cu limfoblaştii (Reyes şi J. F. Bach, 1976). Clasificarea nu are o importanţă deosebită, datorită lipsei unei relaţii între mărime şi funcţii. S-a demonstrat că unele diferenţe de mărime pot fi corelate cu diferitele stadii ale procesului de diferenţiere şi maturare celulară.

Limfocitele mici, majoritare în sînge şi în canalul toracic, sînt considerate celulele-cheie ale sistemului imunitar. Sînt celule cu nucleu rotund sau uşor reniform, avînd un raport mare nucleu/citoplasmă, cu cromatina dispusă în aranjamentele lineare colorate mai dens, amintind spiţele de roată. Citoplasma slab bazofilă conţine cîţiva ribosomi liberi, cîteva mitocondrii şi lizosomi vizibili pe microelectronografii. Complexul Golgi este puţin dezvoltat, iar reticulul endoplasmic este sărac sau absent. Sînt capabile de deplasare lentă, luînd un aspect caracteristic de „oglindă cu mîner", datorat unei expansiuni citoplasmatice posterioare — uropodul

— care asigură contactul limfocitului mobil cu alte celule. Membrana uropodului corespunde, probabil, regiunii în care se concentrează determinanţii de suprafaţă, redistribuiţi în cursul fenomenului de „regrupare" („capping"). Este probabil că uropodul ar reprezenta zona privilegiată de contact cu celulele-ţintă în cursul proceselor de citotoxicitate (Reyes şi J. F. Bach, 1976).

După Daniels, Ritzmann şi Levin (1968), ţesutul limfoid şi limfocitele sînt prezente probabil la toate vertebratele, cu menţiunea că la peşti, amfibieni şi reptile nu s-a produs diferenţierea de la sistemul mieloid. La aceste specii, centrii limfomieloizi sînt dispersaţi pretutindeni în organe. La mamifere, ţesutul limfoid reprezintă ceva mai mult de 1% din greutatea corporală. La omul adult, limfocitele ar reprezenta 0,5—1% din greutatea corporală (Yoffey, 1960). Ele reprezintă în mod normal 25—33% din celulele sanguine sau 1 500—3 000 celule/ml (în medie 2 100 celule/ml).

Dualitatea răspunsului imun. Celulele T şi B. Cercetări experimentale semnificative, precum şi studii clinice au demonstrat existenţa a două tipuri de celule efectoare, limfocitele T şi B, şi respectiv a două tipuri de răspuns imun, imunitatea mediată celular şi imunitatea mediată umoral.

Glick şi colab. (1956) au arătat că îndepărtarea chirurgicală a bursei lui Fabricius la păsări, imediat după ecloziune, inhibă capacitatea producerii de anticorpi, după injectarea de antigene. Warner şi Szenberg (1962, 1964) au demonstrat existenţa la păsări a unei disocieri a sistemului imunitar prin faptul că timectomia efectuată precoce determină întîrzierea fenomenelor de respingere a grefelor şi reduce reacţiile de hipersensibilitate întîrziată, în timp ce bursectomia sau inhibarea dezvoltării bursei cu testosteron sînt fără efect asupra acestui tip de răspuns. Cooper (1966), confirmînd aceste date, a statuat rolul bursei lui Fabricius în producerea imunităţii umorale (exprimată prin biosinteza anticorpilor) şi a timusului în reacţiile mediate celular, cu menţiunea că starea timusului poate influenţa răspunsul în anticorpi pentru anumite antigene. Experienţele pe şoarece au confirmat rolul timusului în respingerea grefelor şi în reacţiile de hipersensibilitate întîrziată şi existenţa la mamifere a unor echivalenţi funcţionali ai bursei lui Fabricius, care asigură prezenţa a două populaţii distincte de limfocite T şi B şi în organele periferice unde produc cele două tipuri de răspuns imun menţionate.

Good şi colab. (1971) atrag atenţia asupra unor observaţii clinice, adevărate experienţe ale naturii, reprezentate de boli care afectează, fie răspunsul imun mediat umoral (anticorpogeneza), fie pe cel mediat celular.

Sindromul Di George, denumit astfel după cel care l-a descris, în anul 1965, este caracterizat prin : 1) aplazia timusului şi a paratiroidelor, datorită dezvoltării embrionare anormale a pungilor branhiale 3 şi 4; 2) lipsă de reactivitate faţă de antigenele care induc la oamenii normali reacţii de hipersensibilitate întîrziată; 3) sinteza normală de Ig; 4) tetanie în primele zile de viaţă.

Hipo- şi agamaglobulinemia congenitală tip Bruton este o boală ereditară umană determinată de un defect genetic, situat pe cromosomul X, care afectează diferenţierea celulelor pre-B. Este caracterizată, în general, prin : 1) lipsa limfocitelor B, deşi numărul celulelor pre-B este normal (~0,6% din celulele nucleate din măduva oaselor); 2) scăderea

concentraţiei Ig serice; 3) absenţa, aproape completă, a foliculilor şi a centrilor germinativi în ganglionii limfatici şi în splină; 4) timusul, în general, normal, ca şi numărul limfocitelor circulante; 5) imunitatea mediată celular normală.

Deficitul fundamental este deci legat de incapacitatea de diferenţiere a celulelor B şi a plasmocitelor şi, în consecinţă, de sinteză a anticorpilor. Ca urmare, bolnavii fac, începînd din lunile a 3-a— a 6-a de naştere (cînd anticorpii materni ajung nivele scăzute), infecţii repetate şi recurente cu bacterii Gram-pozitive şi frecvent boli autoimune şi boli maligne ale ţesutului limfoid. Rezistenţa normală faţă de infecţiile virale şi cu bacterii Gram-negative este neafectată, fiind asigurată de sistemul properdinic şi de imunitatea celulară, care rămîn neafectate (da Silva şi Götze, 1986).

Au fost descrise de asemenea boli genetice care afectează ambele tipuri de celule limfocitare.

Roitt şi colab. (1969), analizînd conceptul celor „două clase" de limfocite au delimitat, cei dintîi, proprietăţile lor caracteristice şi au sugerat denumirile utilizate şi în prezent: 1) *limfocitele T*, diferenţiate şi maturate în timus („Thymus derived"; „thymus processe" sau „thymus dependent") şi 2) *limfocitele* B, maturate independent de timus, în bursa lui Fabricius la păsări sau în echivalenţii ei la mamifere („Bursal equivalent derived"; „non-thymus processed" sau „thymus independent"). Termenii se aplică, deci, în raport cu organul primar în care celulele au fost expuse stimulilor ce induc imunocompetenţa, înainte de a fi diseminate în organele limfoide periferice şi în circulaţie. Denumirea de limfocite B este interpretată frecvent ca provenind de la „Bone marrow", pentru a defini măduva oaselor ca sediu de diferenţiere la mamifere. Graves, Owen şi Raff (1974) consideră că, în lipsa unor probe categorice privind „prelucrarea" celulelor B în măduvă, într-un mod similar celui realizat în bursa lui Fabricius la păsări, această deducţie reprezintă o denaturare a definiţiei originare, capabilă să creeze confuzii. Mamiferele ar putea avea un echivalent funcţional cu unul sau mai multe situsuri difuze.

Originea celulelor limfoide din organele limfoide primare

Iniţial s-a crezut că limfocitele derivă din diferenţierea epiteliului embrionar al organelor limfoide primare (Weakley şi colab., 1964; Sanel, 1967). Tachibana, Imai şi Kojima (1974) au descris etapele de formare a timocitelor, prin transformarea directă a celulelor epiteliale din rudimentul timic al embrionului de şoarece. Numeroase experienţe au confirmat însă ipoteza derivării limfocitelor din celule exogene sistemului, cu origine mezenchimală, care migrează într-o fază foarte timpurie în rudimentul timic (Hammar, 1905; Moore şi Owen, 1967; Leene, 1973). Experienţele de parabioză*, precum şi transferul de celule cu cromosomii

* Parabioză (gr. „para" = alăturat: „bios" = viaţă): în biologia experimentală este unirea chirurgicală a două organisme (spre exemplu, două animale din aceeaşi specie: doi iepuri, doi şobolani etc.) pentru a avea o circulaţie sanguină comună, prin anastomoză vasculară (singrefă siameză).

marcați la animale iradiate au confirmat ipoteza migrării unor celule imature asemănătoare hemocitoblaștilor în timus și bursa lui Fabricius unde se diferențiază sub influența epiteliului acestora. Celulele care, migrează timpuriu au originea la embrion în insulele de sînge din sacul vitelin și în ficatul fetal, iar la adult, exclusiv, în măduva oaselor (Davis și Carter, 1972).

Komuro și Boyse (1973) au arătat că unele celule din măduva oaselor incubate *in vitro* cu extracte timice, dobîndesc o serie de proprietăți fenotipice de suprafață, caracteristice celulelor T. Este probabil că celulele care vor ajunge în timus sînt precondiționate sau „predestinate". Această afirmație s-a bazat pe două observații : 1) prezența unor urme de antigen θ (thêta) pe unele celule foarte imature ; 2) capacitatea unor celule precursoare din măduva oaselor de a produce markeri de celule T, în cîteva minute, după contactul cu hormoni timici, chiar la șoarecele „nud" (care are aplazie timică). Cel mai probabil, acest fenomen este determinat de prezența pe suprafața celulelor imature a unor receptori pentru anumite substanțe din timus (de exemplu, timopoetina).

Aceste date, precum și cele acumulate asupra celulelor B și a hematopoezei, în general, au dus la stabilirea conceptului de celulă-stem.

Terminologie

Pe baza cineticii lor, populațiile celulare din organismele multicelulare pot fi grupate în trei categorii :

1) **Celulele-matcă** („Stem-cell") reprezintă un tip de celule capabile de automenținere (autoreînnoire) pe aproape sau întreaga durată a vieții organismului respectiv, deși o parte din ele sînt îndepărtate prin mecanisme fiziologice sau accidentale. Datorită capacității lor de a produce adeseori mai multe linii și tipuri celulare, inclusiv celule progenitoare, Astaldi și colab. (1980) le numesc *pancitoblaste*. Celulele-stem sînt considerate, în general, ca nediferențiate, fapt considerat ca incorect de către Lajtha (1979), după care populațiile-stem fac parte din populațiile cele mai diferențiate din organism. Ele sînt însă adeseori, ca în cazul celulelor-stem hematopoetice, mai puțin diferențiate decît descendenții lor produși de-a lungul mai multor etape de diferențiere. Celulele-stem care formează doar o mică proporție din populația totală de celule hematopoetice compensează acest handicap, datorită capacității lor de amplificare. Ele produc populații celulare de tranzit, care proliferează, determinînd o amplificare de 32—64 ori, după 5—6 diviziuni, sau de 1 000 de ori, după 10 diviziuni (presupunînd că nu există pierderi de celule). În cazul granulopoezei, amplificarea este de ~ 200 de ori, iar în cazul eritropoezei, de ~ 1 000 de ori.

Celula-stem pluripotentă hemolimfopoetică este o celulă specializată' capabilă să dea naștere diferitelor celule sanguine și/sau limfatice (poliblast, după Astaldi și colab., 1980).

Celula-stem limfoidă este celula-stem angajată în sensul diferențierii pe linia limfoidă (celula T, B etc.), care poate da naștere unor celule progenitoare T sau B.

Reînnoirea și migrarea celulelor-stem se pot realiza prin două mecanisme (fig. 100) : 1) diviziunea unei celule-stem produce două celule-fiice, dintre care una rămîne pe loc împreună cu celula genitoare, iar cealaltă migrează în compartimentul de diferențiere și maturare (modelul $\alpha - n\alpha$) ; 2) o celulă-stem părăsește sediul normal, trecînd în compartimentul de maturare, în timp ce altă celulă-stem formează două celule-fiice identice (modelul $\alpha - 2\alpha$).

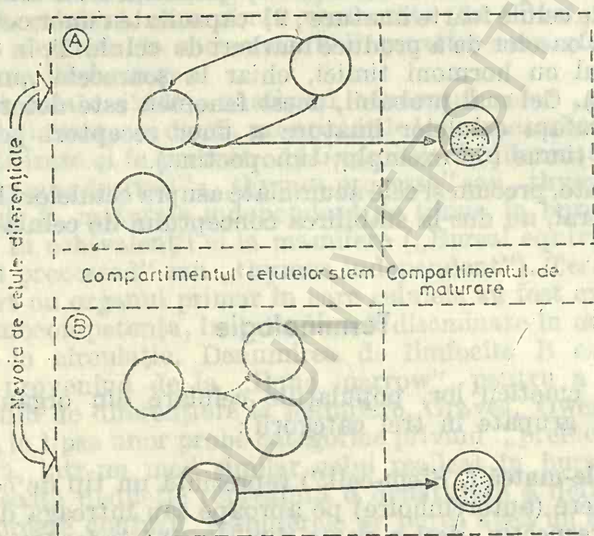


Fig. 100. — Consecințele posibile ale cererii de celule limfocitare diferențiate. Autoreînnoirea stocului de celule-stem se poate face pe două căi : **A.** O celulă-stem intră în mitoză și din cele două celule-fiice una se diferențiază, iar cealaltă rămîne identică celulei genitoare ($\alpha \Rightarrow n\alpha$). **B.** Una din celule trece din compartimentul-stem în cel de maturare, iar altă celulă-stem se divide, pentru a forma două celule-stem identice celei genitoare ($\alpha \rightarrow 2\alpha$) (după Astaldi și colab., 1980).

2) **Celulele în tranzit** sînt celule produse de o populație precursoare, avînd o perioadă de existență limitată și relativ scurtă în organism. Durata lor de viață („timpul de tranzit") este, de regulă, limitată de procesul de „sinucidere prin maturare", în cursul căruia pot pierde capacitatea de proliferare, înainte de a fi eliminate. Procesul de maturare le conferă anumite structuri caracteristice „de vîrstă" („age structures"), relativ ușor de recunoscut (de exemplu, cele corespunzătoare stadiului de mieloblast, mielocit etc.). Frecvent, populațiile de tranzit sînt precursoare ale altor populații de tranzit (prelimfocitul B față de limfocitul B) (Lajtha, 1979).

3) **Celulele statice, care îmbătrînesc** („Decaying cells") sînt populații de celule, ce au ajuns la un anumit stadiu de dezvoltare, în care au pierdut capacitatea de proliferare, chiar limitată, și, de regulă, scad numeric în cursul vieții organismului (de exemplu, neuronii).

Diferențiere. Proces prin care o celulă dobîndește funcții, proprietăți și caracteristici morfologice diferite, ca un fel de specializare sub influența unui inductor (Lajtha, 1972). Implică o schimbare în modul de exprimare genetică, respectiv o modificare fenotipică de natură calitativă : de exemplu, trecerea de la starea de celulă-stem la cea de progenitor sau de la progenitor la precursor. În termeni de informatică, rolul diferențierii constă în a desemna, dintre numeroasele programe înscrise într-o celulă nediferențiată, pe cel care trebuie executat.

Maturare. Spre deosebire de diferențiere, care corespunde angajării celulei („Commited cell") de a urma un anumit program genetic particular, nou, maturarea corespunde însăși derulării și realizării lui. Este perioada cuprinsă între momentul în care celula-țintă primește mesajul ce o angajează la o evoluție, adesea ireversibilă, și cel în care a dobîndit caracterele corespunzătoare. Maturarea se traduce în modificări calitative și cantitative evidente (mai matur, mai puțin matur), sub forma unor proprietăți măsurabile în populația celulară, în raport cu o anumită cronologie.

Automenținere. Capacitatea de proliferare *extensivă* (deoarece se continuă practic toată viața organismului), asigurînd reînnoirea nealterată (fără modificări demonstrabile) a unui tip celular (de exemplu, celula-stem). S-ar realiza prin minimum 50—100 cicluri/celulă.

Amplificare. Proces care asigură creșterea numerică a celulelor terminale fabricate, prin proliferarea populațiilor celulare de tranzit aflate în faza de diferențiere — maturare (progenitori și precursori).

Celulele progenitoare sînt celule de tranzit, provenite din celule-stem, capabile de dezvoltare și diferențiere definită, care prezintă semne structurale de inițiere a unui proces de diferențiere. Pot fi *unipotențiale* (cu angajare limitată la o singură linie de diferențiere ca, de exemplu, progenitor granulocitar, progenitor T sau B etc.) sau *pluripotențiale* (capabile să evolueze spre mai multe linii celulare sanguine).

Celulele precursoare, derivate din celulele progenitoare, aparțin populațiilor celulare de tranzit. Sînt caracterizate printr-un grad mai avansat de maturare, care poate fi recunoscut și caracterizat morfologic. Ele preced celulele efectoare mature de care se deosebesc, de asemenea, prin particularități morfologice și citochimice. După Miller și Stutman (1985), celulele precursoare sînt apropiate de ceea ce Medawar (1963) a denumit *celulă imunologic competentă*. Maturarea celulelor precursoare se realizează prin proliferare, care, deși limitată, produce și amplificarea populației.

Termenul de celulă precursoare este utilizat și într-un sens mai larg, pentru a caracteriza întregul sistem de celule T în ontogeneză pînă la „precursorii" celulelor T_C specifice citolitice (Carnaud și colab., 1984), numite pre-CTL („*C*ytolytic *T* *l*ymphocyte") sau CTL-p, care, în prezența antigenelor, produc limfocite T citolitice (LTC-efectoare).

Linie. Celulele medulare care evoluează spre un anumit tip celular formează o linie, ce poate fi divizată în diferite stadii, în funcţie de gradul lor de maturare (stadii succesive ale celulelor, care evoluează spre morfologia definitivă efectoare).

Linia de celule-stem. Spre deosebire de termenul de celulă-matcă („stem-cell"), care se referă la populaţii de celule dezvoltate într-un organism multicelular, termenul de „linie de celule-stem"se aplică sistemelor care îşi au originea într-o celulă potenţial capabilă de reînnoire, dar care sînt menţinute *in vivo* sau *in vitro*, în condiţii experimentale sau patologice, într-o continuă stare de proliferare.

Unitatea formatoare de colonii CFU („Colony forming unit"). Clasă de celule-stem, prezente în ţesuturile hematopoetice normale, care, după transplantare la un şoarece iradiat letal, proliferează, producînd apariţia de colonii vizibile în splină. Aceste colonii sînt agregate de noi celule diferenţiate (hematii, limfocite, polimorfonucleare, megacariocite) sau agregate dintr-un singur tip de celule diferenţiate.

Competenţă imunologică. Starea unei celule care, deşi nu este efectiv angajată într-un răspuns imun, este totuşi integral calificată pentru a iniţia un astfel de răspuns, cînd este stimulată adecvat de un antigen (Medawar, 1963).

Celulă sensibilă la antigene sau *reactivă la antigene.* Termen folosit iniţial de Kennedy şi colab. (1966) pentru a desemna celulele imunocompetente, care reacţionează cu antigenul, nu prin producerea de anticorpi, ci prin inducere de celule formatoare de anticorpi (plasmocite), prin diviziuni celulare repetate asociate cu diferenţiere progresivă.

„Angajare". Stare a unui limfocit individual, manifestată prin capacitatea de a răspunde la un anumit antigen sau la un grup limitat de antigene înrudite structural. „Angajarea" („Committment") este anterioară primului contact cu un antigen dat şi este determinată de prezenţa pe suprafaţa limfocitelor a unor receptori specifici pentru un anumit determinant antigenic.

Probleme generale ale ontogenezei celulelor răspunsului imun

Studiile de ontogeneză a celulelor sistemului imunitar au fost efectuate, în general, la şoarece, păsări şi om. Deşi datele existente nu permit comparaţii sigure între specii, impresia generală este că debutul diferitelor funcţii imunitare urmează aceeaşi succesiune în timp, la toate speciile, independent de durata gestaţiei sau a vieţii organismelor respective. Cîteva dificultăţi majore complică acest gen de studii : 1) posibilitatea unor tipuri („patterns") diferite de maturare la o vîrstă dată, între liniile genetic diferite de şoarece; 2) intervenţia modulatoare a unor condiţii

de mediu; 3) afectarea procesului de patologia endemică din coloniile de animale; 4) existenţa unor diferenţe „regionale" în diferite organe, la aceeaşi vîrstă şi la aceeaşi linie de animale.

După Stutman (1985), problema ontogenezei imunocitelor poate fi abordată sub două aspecte: 1) *descriptiv*, respectiv marcînd momentul apariţiei lor, în raport cu iniţierea unui anumit organ sau unor funcţii şi cu sediile anatomice iniţiale şi majore în care are loc dezvoltarea; 2) *conceptual*, prin stabilirea caracterului calitativ asemănător sau diferit al structurilor şi funcţiilor, comparativ cu cele ale organismului complet dezvoltat.

Cu toate dificultăţile întîmpinate, studiile de ontogeneză a funcţiilor imunitare au adus o serie de date importante privind: 1) momentul apariţiei diferitelor celule într-un anumit situs anatomic (timus, splină etc. la şoarece; sîngele cordonului ombilical şi ţesuturile fetale la om); 2) perioada de vîrstă cînd funcţia lor ajunge nivelul normal de la adult; 3) mecanismul reactivităţii imune scăzute la vîrstele mici. Cu toate acestea, ontogeneza limfocitelor este relativ puţin cunoscută. Într-o încercare de reprezentare grafică a unui model de dezvoltare a celulelor T, Scollay şi Shortman (1983) au arătat că din 15 parametri necesari pentru înţelegerea acestui proces, trei sînt bazaţi pe date certe şi 12 pe date discutabile. În etapa actuală, o dificultate obiectivă pentru înţelegerea ontogenezei celulelor sistemului imunitar este legată şi de faptul că desfăşurarea ei este descrisă în raport cu faze diferite, stabilite pe criterii variate, de diferiţi autori, precum şi pe o nomenclatură neuniformă în care denumirile mai vechi, coexistă cu cele mai noi.

Celulele-stem pluripotente (engl. „Stem-cell" „stem"=ramură, linie de descendenţă) sînt celule mezenchimale care îşi au originea foarte timpuriu în insulele primitive sanguine şi în sacul vitelin al embrionului (Dieterlen-Lievre, 1974). Sacul vitelin pare să fie singurul situs din organism unde are loc diferenţierea *de novo* a celulelor-stem. În toate celelalte organe, hematopoeza este iniţiată de celulele-stem, care au migrat din sacul vitelin pentru a le popula. Migrarea are loc iniţial în ficat, apoi în splină şi final în măduva oaselor unde persistă tot restul vieţii.

Celula-stem este multipotenţială. Ea poate da naştere prin diferenţiere tuturor celulelor din sînge, respectiv granulocitelor, eritrocitelor, mononuclearelor şi macrofagelor, limfocitelor, megacariocitelor şi mastocitelor (fig. 101). Diferenţierea lor are loc, iniţial, în linia eritroidă şi mieloidă, şi tardiv, în direcţia limfocitelor T şi B (Moore şi Owen, 1967; Cooper şi colab., 1984). Celula-stem multipotenţială poate produce şi unele celule-stem cu capacitate de diferenţiere limitată la una sau două linii celulare în hematopoeză.

Aceste linii de celule progenitoare, care au evoluat deja în direcţia unei anumite căi particulare de diferenţiere (spre exemplu, în linia mieloidă), pot reţine capacitatea de proliferare extensivă şi de maturare la celule terminale. Celulele-stem multipotente sînt „însămînţate" pe calea circuitului sanguin în diferite ţesuturi hematopoetice, în care diferenţierea lor este orientată într-o anumită direcţie, controlată de influenţele inductoare microambientale, proprii locului în care au migrat.

Caracterul multipotent al celulelor-stem a fost demonstrat pe mai multe căi :

1) Injectarea de suspensii celulare care conţin celule-stem nespecializate restabileşte întreaga serie de celule normale la animale cu pancitopenie (epuizarea celulelor complexului limfomieloid), consecutivă expunerii totale a corpului la doze letale de radiatii ionizante.

2) Utilizarea de celule-stem cu aberaţii cromosomale unice, induse prin mutageneză, pentru repopularea măduvei oaselor, la animale iradiate letal are drept urmare producerea de celule, în diferite organe (măduvă, splină, ganglioni etc.), cu aceeaşi anomalie. Aceasta demonstrează că toate aparţin aceleiaşi clone.

3) Injectarea unei suspensii de celule din măduva oaselor la şoareci iradiaţi este urmată de apariţia în splină a unor colonii mixte, ce conţin hematii, granulocite, limfocite, megariocite etc., care coexistă cu colonii formate predominant sau exclusiv dintr-un singur tip de celule.

Morfologia celulelor-stem nu este definită exact. Ele ar corespunde unor celule bazofile mari, prezente predominant în faza embrionară timpurie. La om, au fost descrise sub diferite forme şi denumiri. Identificarea lor se poate face prin evidenţierea prezenţei unor markeri de suprafaţă ca : 1) markerul TdT corespunzînd enzimei *t*erminal-*d*ezoxinucleotidil *t*ransferaza ; 2) un antigen de tip Ia („Ia-like"), de histocompatibilitate ; 3) un antigen denumit BAS (*B*rain *a*ssociated *s*tem cell antigen), întîlnit şi în celulele din creier.

Menţinerea relativ constantă a rezervei de celule-stem se face prin capacitatea lor de autoreînnoire prin diviziune. După Cooper (1984), diviziunea celulelor-stem ar fi asimetrică : celulele care se divid produc o celulă-fiică, ce începe diferenţierea, şi o a doua celulă care rămîne relativ nediferenţiată, pentru a servi ca sursă (matcă) pentru generaţiile viitoare de celule nediferenţiate. Experimental s-a demonstrat că potenţialul de autoreînnoire a celulelor-stem poate să depăşească durata vieţii animalului de la care provin. Astfel, Barnes şi colab. (1959) au reuşit să transplanteze, anual, o anumită populatie de celule din măduva oaselor de şoarece la grupuri succesive de şoareci receptori iradiaţi, timp de 4 1/2 ani (deci, de două ori durata de viaţă a şoarecelui donator), înainte de a-şi pierde capacitatea protectoare.

Migrarea şi diferenţierea celulelor-stem au loc nu numai la animalele în curs de dezvoltare sau la cele care se vindecă după iradiere, ci, cu o frecvenţă limitată, şi la animalele adulte normale. Numărul celulelor-stem la adultul normal este mic, dar creşte ori de cîte ori organismul este supus unei solicitări suplimentare ca, de exemplu, după stimularea cu un antigen, recuperarea după iradiere etc. Este posibil ca, în condiţii fiziologice, celulele-stem pluripotente să fie folosite pentru a mări şi menţine constantă concentraţia diferitelor linii de celule progenitoare, care asigură înlocuirea celulelor dispărute prin uzură, vîrstă înaintată etc. La adult, celulele-stem sînt localizate în special în măduva oaselor, deşi alte organe ca, de exemplu, splina pot conţine celule-stem, care preiau

producerea de celule în cazurile în care măduva oaselor devine nefuncțională (Melchers, 1985).

Diferențierea progenitorilor limfoizi, pre-T și pre-B, de la celula-stem pluripotentă s-ar putea realiza pe două căi: direct sau indirect, respectiv prin intermediul unui progenitor limfoid comun (fig. 101).

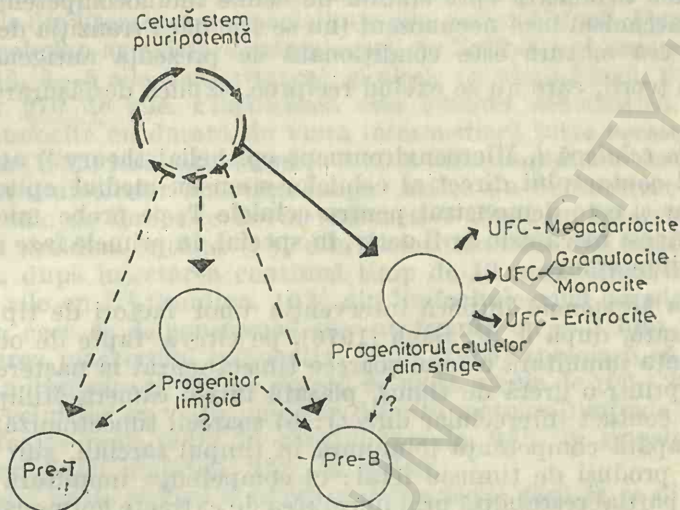


Fig. 101. – Căile posibile de diferențiere a celulelor-stem pluripotente la progenitori limfatici (pre-T și pre-B): calea directă și calea indirectă, printr-o celulă progenitoare limfoidă comună. Între celula pre-B și progenitorul celulelor sanguine ar exista unele afinități fenotipice și eventual interschimb (după Astaldi și colab., 1980).

Diferențierea și maturarea limfocitelor

Sacul vitelin reprezintă primul organ hematopoetic activ la embrionii mamiferelor. El este, în mare măsură, limitat la producerea de eritrocite și de celule-stem multipotente. În cea mai mare parte a embriogenezei * organul hematopoetic cel mai important este ficatul fetal **, locul de multiplicare al celulelor-stem multipotente și în care ar apărea primele celule cu morfologie limfoidă (Owen, 1977). În viața fetală tardivă și în toată viața adultă, sursa majoră de celule-stem hematopoetice este măduva oaselor.

În prezent există un acord unanim asupra faptului că diferențierea și maturarea limfocitelor s-ar face în două faze distincte:

---

* *Embrion*: la animale, derivat al oului fecundat, aflat în faza de creștere cea mai rapidă (pînă la apariția structurilor majore). La om corespunde organismului în dezvoltare în perioada cuprinsă între ~ 2 săptămîni de la fecundare pînă la sfîrșitul săptămînilor a 7-a și a 8-a.

** *Fetus*: organism în uter, în perioada postembrionară cuprinsă, la om, între 7 și 8 săptămîni după fecundare pînă la naștere.

1) **Faza independentă de antigene** corespunde unor etape de diferenţiere în care limfocitele dobîndesc funcţia de imunocompetenţă. Este legată de apariţia receptorilor specifici pentru antigene pe suprafaţa celulelor, precum şi a structurilor şi mecanismelor celulare necesare pentru a răspunde la antigene. Ea se desfăşoară în organele limfoide primare şi are drept rezultat producerea de celule imunocompetente (T şi B) virgine. Acestea evoluează spre stadiul de celule imunocompetente mature printr-un mecanism încă necunoscut (nu se ştie dacă tranziţia de la celula virgină la cea matură este condiţionată de prezenţa antigenelor).

Două teorii, care nu se exclud reciproc, explică desfăşurarea acestei faze:

Teoria celulară („Microenvironment epithelial theory") atribuie un rol esenţial contactului direct al celulelor-stem cu mediul epitelial timic sau medular şi este demonstrat pentru celulele T, pe probe microelectronografice. Acest mecanism ar fi activ, în special, în primele faze ale procesului de diferenţiere.

Teoria hormonală implică intervenţia unor factori de tip endocrin Ea este bazată, după J. F. Bach (1976), pe cîteva fapte de observaţie: a) competenţa imunitară a unui şoarece timectomizat la naştere poate fi restabilită printr-o grefă de timus, plasată într-o cameră Millipore (respectiv fără contact intercelular direct); b) şoarecii timectomizaţi la naştere îşi recapătă competenţa imunitară în timpul sarcinii, sub influenţa hormonilor produşi de timusul fetal; c) competenţa imunitară ar putea fi cel puţin parţial restabilită prin injectarea de extracte hormonale timice. În fapt, cele două mecanisme acţionează practic sinergic.

2) **Faza dependentă de antigen** corespunde etapei în care limfocitele imunocompetente, devenite mature, sînt stimulate de prezenţa antigenelor la nivelul organelor limfoide secundare. Ele încep să prolifereze, continuîndu-şi procesul de evoluţie, spre stadiile de celule efectoare a răspunsului imun şi de celule cu memorie.

Cele două faze principale descrise evoluează, la rîndul lor, într-o serie de etape succesive. Fiecare etapă produce o celulă, cu un anumit grad de maturare definit prin prezenţa unui set distinct de antigene de suprafaţă, care reprezintă în practică markeri biochimici foarte utili pentru identificarea diferitelor stadii de diferenţiere.

Paralel cu procesul de formare a diferitelor tipuri de celule efectoare, de reglare, cu memorie, avînd funcţii şi caracteristici diferite, diferenţierea divergentă a limfocitelor creează prin rearanjare genetică clone celulare, cu o diversitate enormă de specificităţi de legare cu antigenele. Păstrînd proporţiile, diferenţierea limfocitelor poate fi asemănată cu un arbore genealogic, care se ramifică progresiv, asemănător celui al diversităţii celulare la metazoare, în care celula-ou, unică, dă naştere numeroaselor tipuri de celule diferenţiate ale organismului adult.

Durata vieţii limfocitelor reprezintă intervalul de timp dintre două diviziuni mitotice (intervalul intermitotic) sau dintre o ultimă diviziune şi moartea celulelor. Poate fi apreciată urmărind prin autoradiografie încorporarea precursorilor radioactivi (^{3}H-timidina) ai ADN, adminis-

trați *in vivo*, o perioadă scurtă de timp (contact rapid) sau îndelungat (administrare prin perfuzie sau injecții repetate). În funcție de condițiile experimentale, se apreciază durata vieții limfocitelor în raport de apariția și/sau persistența radioactivității intracelulare. Presupunînd că toate celulele care se divid încorporează ^{3}H-timidina și că aceasta este disponibilă pentru toate celulele, se poate deduce că limfocitele nemarcate provin din diviziuni care antedatează injectarea markerului radioactiv.

Datele din literatura de specialitate sînt contradictorii. După Everett (1964), la șobolan ar exista două categorii de limfocite și anume unele cu viață scurtă, 4—5 zile (majoritatea), și altele cu viață lungă, putînd persista chiar 270 de zile. Clasificarea este evident schematică, deoarece există și limfocite cu durată de viață intermediară între aceste extreme. După Mota (1986) însă, atît la om, cît și la diferite animale de laborator, majoritatea limfocitelor au viață lungă. Astfel s-a demonstrat că numai un număr mic de limfocite devin radioactive după un interval scurt de contact cu timidina tritiată (1% din limfocitele mici din canalul toracic la șobolan, după injectarea continuă timp de 12 ore). După un contact de 200 de zile cu ^{3}H-timidina, 10% din limfocitele mici circulante rămîn nemarcate, ceea ce demonstrează că s-au format cu ~ 7 luni înainte de administrarea markerului radioactiv. Mota (1986) apreciază că, *per total*, ~ 80% din limfocite ar avea o durată de viață medie de 100—200 de zile. Proporția celulelor cu viață lungă în diferite sectoare limfoide la șobolan ar diferi foarte mult (90% în canalul toracic, 66% în sîngele periferic, 75% în ganglionii limfatici, 25% în splină).

La om, unele limfocite ar putea supraviețui fără să se dividă ~ 10 ani. Datele se bazează pe examinarea limfocitelor provenite de la persoane expuse radioterapiei cu 10 ani anterior studiului. Stimularea limfocitelor respective *in vitro*, cu hemaglutinină, a evidențiat prezența unor alterări cromosomale, incompatibile cu supraviețuirea celulelor postmitotice. Aceasta demonstrează că leziunile observate în cursul mitozelor au fost produse cu ocazia iradierii inițiale. Se apreciază că subpopulațiile de celule T și B ar conține aproximativ aceeași proporție de celule cu viață scurtă și lungă. După Sprent și Miller (1972), celulele T cu viață lungă, corespunzînd celulelor cu memorie, ar trăi mai mult decît echivalentul lor din populația de celule B.

Migrarea limfocitelor spre regiunile limfoide specifice

Studiul comparat al sistemului limfoid la animale normale și timectomizate, corelat cu modificările asociate cu reacțiile de imunitate mediată celular sau umoral, a permis individualizarea unor zone specifice timodependente și timoindependente de localizare a celulelor T și respectiv B.

Zonele timodependente, populate de celule T, cuprind cortexul profund (regiunea paracorticală) al ganglionilor, manșonul (teaca) limfoid periarteriolar din pulpa albă a splinei și zonele inter- și suprafoliculare ale plăcilor Peyer.

Zonele timoindependente includ foliculii din cortexul extern al ganglionilor şi al plăcilor Peyer, foliculii şi zona periferică ale pulpei albe a splinei, formate din celule B.

Teritoriile mixte sînt reprezentate de zona marginală şi pulpa roşie ale splinei, ca şi de regiunea medulară a ganglionilor. Ele sînt zone populate predominant de celule B, dar, în acelaşi timp, sînt zone de circulaţie şi pentru celulele T.

Capacitatea celor două tipuri de limfocite T şi B de a popula regiuni distincte, de a migra şi de a se reîntoarce în aceste locuri privilegiate ale organelor limfoide secundare a fost denumită *ecotaxie* (de Sousa, 1973) sau *fenomen de „homing"* (engl. „home" = cămin). El a fost studiat urmărind localizarea diferitelor tipuri de celule marcate cu izotopi radioactivi, injectate intravenos, la animale singenice. S-a demonstrat capacitatea diferitelor limfocite de a recunoaşte şi de a coloniza selectiv anumite teritorii specifice. Astfel, limfocitele din timus şi canalul toracic migrează preferenţial în zonele timodependente, în timp ce celulele splenice — T şi B — se repartizează în compartimentele periferice corespunzătoare (Piepernik, 1976).

Bazele moleculare ale fenomenului de „homing". Iniţial, ecotaxia limfocitelor a fost explicată prin diferenţele de structură a tramei reticulare a diferitelor compartimente limfoide, prin două mecanisme diferite : 1) trama mai laxă a zonelor timodependente ar putea selecţiona celulele T, care ar avea o mobilitate specială ; 2) prin diferenţele de adezivitate a celor două tipuri de celule. Celulele T, mai puţin aderente, au o mobilitate diferită de cele din zonele timoindepedente, aderente.

După datele actuale, tendinţa de „homing" este controlată de prezenţa pe celulele B şi T virgine şi mature a unor receptori de suprafaţă, care dirijează pătrunderea şi fixarea lor preferenţială în anumită zone ale organelor limfoide. În acest proces, un rol esenţial revine interacţiunilor dintre receptorii limfocitari şi receptorii complementari de pe celulele mari specializate ale venulelor postcapilare (fig. 102). Caracterul specific al acestor interacţiuni face ca numai celulele T şi B imunocompetente să se poată lega şi să traverseze pereţii venulelor. Selectivitatea procesului de „homing" decurge din faptul că celulele endoteliale ale venulelor postcapilare din diferite organe poartă receptori deosebiţi, caracteristici (Paul şi colab., 1984). Unele date experimentale pledează în favoarea acestui punct de vedere :

1) Astfel, la şoarece există cel puţin două tipuri de receptori limfocitari : unul dirijează procesul de „homing" spre venulele postcapilare din ganglionii limfatici, iar celălalt, spre venulele din plăcile Peyer.

2) O serie de experienţe au demonstrat caracterul specific al migrării celulelor T şi capacitatea lor de a se lega direct *in vivo* şi *in vitro* de celulele endoteliale ale venulelor postcapilare.

3) Celulele rezidente în plăcile Peyer se reîntorc preferenţial la nivelul acestora. Tratarea lor cu enzime care degradează moleculele de suprafaţă celulară împiedică legarea de endoteliul venulelor postcapilare şi suprimă tipul de „homing" specific.

4) Tratarea unei populaţii complexe de celule T cu anticorpi monoclonali cu specificitate faţă de o moleculă de suprafaţă celulară, necesară pentru localizarea lor specifică în ganglionii limfatici, anulează capacitatea de legare de endoteliile venoase din ganglioni, ca şi capacitatea celulelor T periferice de a migra în ganglionii limfatici periferici. Celulele dintr-o populaţie cu specificitate pentru plăcile Peyer îşi păstrează nealterată capacitatea de migrare selectivă în teritoriul specific.

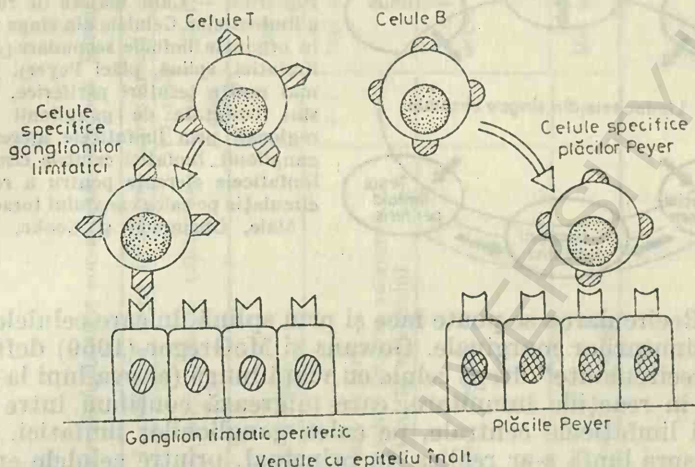


Fig. 102.— Model ipotetic pentru explicarea bazelor moleculare ale fenomenului de „homing" prin interacţiunea dintre moleculele specifice de pe celulele venulelor cu endoteliu înalt din diferite organe limfoide şi receptorii de pe suprafaţa limfocitelor (după Male, Champion şi Cooke, 1987).

Migrarea selectivă a limfocitelor în anumite organe şi în zone specifice ale acestora este un fenomen cu importanţă esenţială în imunitate:

1) Ea are un rol critic în embriogeneza organelor limfoide, deoarece asigură migrarea în timus şi respectiv în bursa lui Fabricius sau în echivalenţii ei, la mamifere, a precursorilor celulelor T şi B, reprezentaţi de celule „preangajate" („precomitted") pentru un singur program de diferenţiere şi care sînt capabile să „recunoască", în prealabil, organul în care trebuie să migreze.

2) Fenomenul de „homing" asigură revenirea limfocitelor dintr-un anumit organ, în organul respectiv, după ce au circulat în organism.

3) Asigură menţinerea populaţiilor de limfocite în organele limfoide, controlînd raportul caracteristic dintre celulele T şi B (2,5 în ganglionii limfatici; 0,5 în splină; 0,4 în plăcile Peyer) (Hood şi colab., 1984).

Recircularea limfocitelor

Celulele limfoide sînt concentrate în organele limfoide primare şi secundare. Numai o mică proporţie circulă în sînge şi, practic, o minori-

tate dintre ele „recirculă", adică părăsesc sîngele pentru a urma calea : ganglioni limfatici → limfă → canalul toracic → sînge (fig. 103).

Existenţa acestui proces a fost demonstrată de Gowens (1959), care a arătat pe şobolan, că limfocitele recoltate prin fistule ale canalului toracic, reinjectate intravenos după marcare cu (^{3}H)timidină, reapar

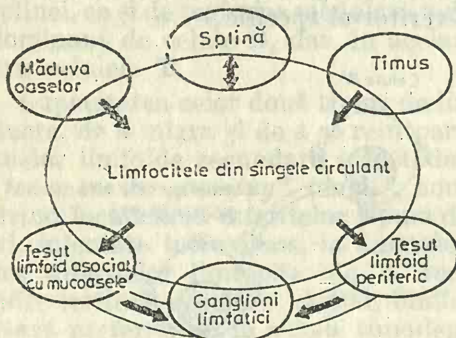


Fig. 103. — Căile majore de recirculare a limfocitelor. Celulele din sînge migrează în organele limfoide secundare (ganglioni limfatici, splină, plăci Peyer), prin cele mai multe ţesuturi periferice, de unde sînt colectate de ganglionii limfatici regionali prin limfaticele aferente. Din ganglionii limfatici celulele circulă prin limfaticele eferente pentru a reintra în circulaţie pe calea canalului toracic (după Male, Champion şi Cooke, 1987).

în limfă. Recircularea se poate face şi prin splină, în care celulele pătrund pe calea sinusurilor marginale. Gowans şi McGregor (1969) definesc limfocitele „recirculante" drept celule cu viaţă lungă (cîteva luni la şobolan), implicate în reacţiile imunitare, care migrează continuu între circuitul sanguin şi limfaticele centrale, pe calea ganglionilor limfatici. Migrarea din sînge spre limfă s-ar realiza, în principal, printre celulele endoteliale specializate care mărginesc venulele postcapilare din ganglionii limfatici şi plăcile Peyer, deşi nu este exclusă şi traversarea directă prin celulele endoteliale. După migrare prin ganglioni, intră în limfaticele eferente şi trec pe calea canalului toracic în sînge. Durata circuitului la şobolan este de 14 ore (Ford şi Marchesi, 1971).

Sprent (1977) propune următorul model de formare a stocului de limfocite recirculante : limfocitele virgine (Tv), produse de timus şi Bv, produse în măduvă şi probabil şi în alte organe, migrează în număr mare din aceste organe primare, în cea mai mare parte, spre splină, unde mor relativ repede, dacă nu întîlnesc antigenele specifice corespunzătoare. Ele nu recirculă. În cazul injectării unui antigen, limfocitele T şi B corespunzătoare sînt „captate" în organele limfoide, respectiv în splină, în cazul introducerii intravenoase sau în ganglionii limfatici regionali, după injecţia subcutanată*. După stimularea de către antigen, ele se diferenţiază în celule efectoare, care produc un răspuns imun primar specific pentru antigen, şi în celule cu memorie (Tm şi Bm). Celulele cu memorie se asociază stocului de limfocite recirculante preexistent, devenind parte integrantă a acestuia.

Modelul limitează noţiunea de limfocit recirculant la un amestec de celule cu memorie, specifice antigenelor, pe care organismul respectiv le-a întîlnit anterior. Studiul complex al limfocitelor din canalul toracic a demonstrat că ele formează o populaţie mixtă de celule T şi B cu viaţă

* După unii cercetători, captarea limfocitelor în organele limfoide nu este integral specifică, dar este în mod special evidentă pentru limfocitele corespunzătoare antigenului injectat. Limfocitele captate nespecific ar fi reţinute mai puţin timp.

Tabelul nr. 34

Proprietățile limfocitelor mici, T și B recirculante, precum și ale limfoblaștilor corespunzători (după Sprent, 1977)

Celulele	Capacitatea de recirculare	Viteza de recirculare	Localizarea după injectarea intravenoasă				
			Splină	Ganglioni limfatici	Intestin subțire (distribuție)	Intestin gros	Durata medie de viață
Limfocite T mici	++++	Mare	++++	+++	++ Plăci Peyer	+	Mai multe luni
Blaste T	++++	Mare	+++	+	+++ Plăci Peyer, Lamina propria adiacentă Suprafața epiteliului	++	Mai multe zile
Limfocite B mici	șobolan ++? șoarece +	Mică Mare, dar rară	++++	+	+ Plăci Peyer	+	> o lună (mai puțin decît celulele T)
Blaste B	+	Mare	++	+	+++ Lamina propria	+	Mai multe zile

lungă (confirmînd acest punct de vedere), din care numai 2 — 5% sînt limfocite mari, de tip blastic, cu proprietăți parțial diferite (tabelul nr. 34). După J. F. Bach (1977), majoritatea limfocitelor recirculante sînt de natură timică (80 — 90% din celulele din canalul toracic, marcate cu timidină și reinjectate la gazde singenice migrează selectiv în regiunile timodependente).

Recircularea limfocitelor este un proces deosebit de important, deoarece permite reacția acestora cu antigenele, interacțiunile celulare cooperante și asigurarea diseminării limfocitelor stimulate și cu memorie în organism.

Limfocitele T

„Limfocitele T au funcția de dirijor al orchestrei imunologice, fiind, în același timp, frecvent vioara întîia".

H. WIGZELL

Dezvoltarea limfocitelor T a fost mult studiată la șoarece și la om la care se realizează în trei stadii succesive :

1) stadiul pretimic, corespunzînd evenimentelor din țesuturile hematopoetice, are ca rezultat proliferarea celulelor-stem și migrarea descendenților lor „angajați" spre evoluția în direcția liniei T, care se deplasează în timus ;

2) stadiul intratimic și

3) stadiul posttimic, realizat în organele limfoide secundare, după migrarea celulelor „prelucrate" în timus.

S-ar mai putea adăuga un stadiu extratimic, ce include uzual evenimente ce se petrec la periferie, acționînd fie asupra unor celule posttimice, incomplet maturizate, fie asupra unor celule care au fost expuse numai la acțiunea produșilor derivați din celulele posttimice mature.

În primele două stadii, maturarea este independentă de antigen și determină formarea unei populații de celule T cu viață scurtă, specifice pentru antigen (limfocite virgine, imunocompetente). În cursul fazelor ulterioare, celulele T întîlnesc antigenul specific și se diferențiază sub influența lui, la diferitele categorii de celule efectoare și de celule cu memorie (fig. 104).

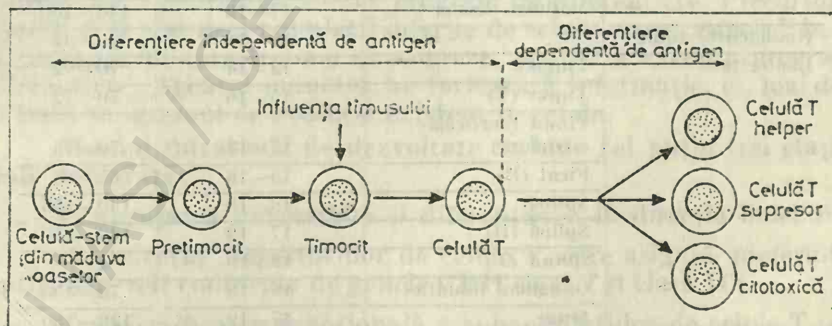


Fig. 104. — Reprezentare schematică a căilor de maturare a limfocitelor T. Diferențierea în timus, independentă de antigen, produce o populație de celule T specifice pentru antigen, imunocompetente, cu viață scurtă. În prezența antigenului specific, ele se diferențiază în celule efectoare (după Haeney, 1984).

Evenimentele pretimice

Cele mai multe date referitoare la compartimentul pretimic de dezvoltare a celulelor T sînt controversate. Celulele prezente în această fază au fost descrise, în lipsa unor criterii concrete, sub diferite denumiri ca: pretimocite, protimocite, celule-stem limfoide, celule care migrează în timus etc.

Există un acord unanim în a considera că toate celulele limfoide din timus au origine exogenă, fiind rezultatul colonizării stromei timice cu celule-stem de origine hematopoetică. Spre deosebire de Moore şi Owen (1969), care consideră sacul vitelin ca sursă primară extraembrionară de celule-stem, Martin şi colab. (1976) admit că acestea ar proveni din unele situsuri intraembrionare, generate, la rîndul lor, de celulele migrate din sacul vitelin. Analizînd critic controversele referitoare la natura ţesutului embrionar care acţionează ca sursă de celule hematopoetice, Stutman (1985) admite că celulele din sacul vitelin sînt incapabile să migreze direct în timus, deoarece au nevoie de o etapă intermediară de maturare, în ficatul embrionar. Oricum, după 11 — 12 zile de gestaţie la şoarece (respectiv după ~ 70 — 72 de zile la om), timusul este populat de celule mari, bazofile, cu origine hematopoetică, ce pot fi considerate ca precursori limfocitari (tabelul nr. 35).

Tabelul nr. 35

Dezvoltarea limfohematopoezei la şoarece şi la om (după Stutman, 1985)

Organul sau ţesutul		Ziua apariţiei în cursul gestaţiei	
		Şoarece	Om
Durata perioadei de gestaţie		19—21	270
Hematopoeza	Sac vitelin	6—8	21—28
	Ficat	10—12	42—45
	Splină	15—16	90—100
	Măduva oaselor	17—18	140—150
Rudimentul timic		10—11	40—42
Limfocite*	Timus	12—14	70—72
	Timus (T)	15—16	70—72
	Timus (corticală-medulară)	17—18	70—75
	Ficat (B)	15—16	65—68
	Splină	16—18	140—150
	Splină (B)	17—19	140—150
	Splină (T)	18—19	?
	Ganglioni limfatici	18—19	70—130
	Sînge	17—19	120—130
	Plăci Peyer	19-naştere	120?

* Termenul „limfocite" marchează prima apariţie a celulelor cu morfologie limfoidă, ca şi apariţia celulelor T (definită prin markeri de suprafaţă ca Thy-1 la şoarece) şi B (definite prin prezenţa Ig pe suprafaţă sau în citoplasmă).

Conceptul de protimocit. Ideea existenței unui stadiu de „angajare pretimică a liniei T a fost sugerată de observația că o parte din celulele din măduvă pot fi induse să exprime antigene de suprafață, caracteristice timocitelor, dacă sînt expuse *in vitro* la acțiunea mai multor compuși care măresc concentrația AMPc. Unii dintre acești compuși ar corespunde hormonilor timici.

Komuro și Boyse (1973) au numit aceste celule inductibile protimocite („Prothymocytes") și le-au descris proprietățile: 1) inducția „maturării" lor *in vitro* produce o celulă cu caracteristicile timocitului și nu ale celulei T periferice; 2) sînt imunologic nefuncționale după inducție 3) apar timpuriu în ontogeneză (la 14 zile în ficatul embrionar); 4) par să se dezvolte independent de timus (sînt prezente în splină și în măduvă la șoarecele „nud"); 5) corespund, probabil, celulelor care repopulează timusul la șoarecii iradiați total.

După Stutman (1986), protimocitele ar putea fi identice cu celulele descrise de Lapault și colab. (1983) sub denumirea de celule care migrează în timus („Thymus homing cells").

Evenimentele intratimice

Maturarea intratimică a limfocitelor T are foarte multe etape misterioase (Reichert, 1985).

Celulele precursoare provenite din măduva oaselor și din ficatul fetal intră în cortexul subcapsular al timusului unde, prin diferențiere, dobîndesc o serie de funcții specializate. Acestea implică: 1) posibilitatea de a răspunde la antigene specifice; 2) capacitatea de diseminare în compartimentele limfoide extratimice; 3) producerea de limfokine; 4) exercitarea de funcții de reglare sau citotoxice, respectiv capacitatea de a efectua ansamblul de funcții ce caracterizează imunocompetența.

Goldstein (1977) consideră că celulele precursoare, care se diferențiază *in vitro* în timocite și respectiv în bursocite, sînt „preangajate" („Precommitted") pentru un singur program de diferențiere. Precursorii celulelor T și B sînt deci populații diferite de celule, care „cunosc" în prealabil organul în care trebuie să migreze, pentru a executa programul de diferențiere. Agentul inductor nu furnizează informație, ci, mai degrabă, inițiază programul de evoluție existent în celule.

Stadiul intratimic de dezvoltare include cel puțin trei etape esențiale integrate;

1) angajarea ireversibilă și diferențierea în direcția liniei T;

2) „selecția" repertoriilor de celule T, care asigură preferința spre antigenele self codificate de genele CMH clasa I și clasa II;

3) diversificarea funcțională a subpopulațiilor de celule T.

Procesul implică astfel, pe lîngă angajarea ireversibilă în direcția liniei T, inițierea rearanjărilor genetice, care duc la exprimarea receptorului T, precum și definirea repertoriului inițial de celule, în raport cu produșii genelor CMH.

Stutman (1985) a propus un model de dezvoltare concordantă sau complementară a celulelor T, bazat pe conceptul interacțiunilor celulă-celulă aplicat funcțiilor imune. El consideră că „unitatea de bază" a diferențierii intratimice ar fi reprezentată de un set de celule-perechi, dintre care una ar fi pretimocitul, care se diferențiază și eventual produce o celulă funcțională, iar cealaltă o celulă inductoare ce face parte din stroma timică nelimfoidă.

Ontogeneza limfocitelor T ar implica selecția pozitivă a unor „perechi concordante" de pretimocite cu partenerii lor inductori. Perechile „neconcordante" ar fi selecționate intratimic negativ, deoarece ele produc diferențieri nefuncționale. Acest proces are un rol esențial în „educația" celulelor T. În cursul șederii în timus, celulele-stem suferă o serie de diviziuni, devenind celule „blast", mari pironinofile, și apoi, progresiv, celule tot mai mici, pînă ajung la dimensiunile și morfologia celulelor descrise sub denumirea de timocite. Paralel cu acest proces, ele suferă o serie de modificări fenotipice ale suprafeței celulare.

Cînd maturarea ajunge o anumită fază, celulele T părăsesc timusul și trec în circulație, unde rămîn perioade relativ îndelungate, cu localizări, la intervale diferite, în regiunile timodependente din ganglioni, splină și alte țesuturi limfoide. Celulele T se găsesc în concentrații mari în limfa din canalul toracic și sînge. Sînt mai abundente în ganglionii limfatici decît în splină și relativ rare în măduvă.

Evenimentele posttimice

Existența unui compartiment posttimic, în care s-ar realiza proliferarea și maturarea celulelor T exportate, a fost admisă recent pe baza unor argumente indirecte;

1) Deși datele cantitative sînt relative, Stutman (1985) apreciază, pe bază de calcul matematic, că numărul celulelor T periferice nu poate fi menținut constant numai pe baza exportului din timus.

2) În plus, stimularea cu ajutorul antigenelor nu influențează numărul celulelor exportate, care rămîne constant, chiar cînd există condiții de „cerere" mărită la periferie.

3) Deși timusul murin adult produce zilnic $\sim 10^8$ limfocite T, numai o mică parte dintre ele (2×10^6/zi) sînt exportate, restul murind, probabil, în interiorul timusului, la nivelul corpusculilor Hassal, care conțin macrofage, celule epiteliale și resturi celulare. Nu se cunosc cauzele acestei supraproducții masive de limfocite. În plus, o mare parte, (30 — 40%) din rezerva totală de limfocite T are un turnover rapid, Aceste date demonstrează necesitatea unei amplificări extensive a celulelor T exportate în compartimentul posttimic.

Inițial, s-a considerat că menținerea echilibrului numeric (cantitativ) al celulelor T s-ar realiza, predominant sau exclusiv, pe seama celulelor mature, care ar fi stimulate să prolifereze la periferie sub influența antigenelor exogene. Date mai noi au demonstrat însă, fără echivoc, că timusul exportă o populație heterogenă de celule, care include, pe lîngă o fracțiune de celule mature funcțional și alte tipuri de celule, ca progenitorii

posttimici, care pot prolifera și se pot matura la periferie (Stutman, 1985).

Prezența celulelor T imature (cu fenotip imatur și/ sau cu diferențe de comportare funcțională sau de repertoriu) la periferie, la om și la șoarece, demonstrează că cel puțin în cursul ontogenezei și al stadiilor perinatale timpurii, timusul poate exporta celule T imature sau doar parțial diferențiate. Blue și colab. (1985) nu exclud posibilitatea unei dediferențieri la periferie, urmată de reversia unor celule T mature la fenotipul imatur, consecutive activării lor. În prezent nu există un acord privind caracteristicile, proporția și denumirile celulelor care părăsesc timusul incomplet maturizate:

1) **Celulele recent emigrate din timus.** Sollay și colab. (1980) au demonstrat posibilitatea evidențierii celulelor care au părăsit recent timusul, prin marcarea timocitelor cu izotiocianat de fluoresceină, injectat direct în acest organ. Ele pot fi evidențiate la șoarecele adult, după 3 — 4 ore de la marcare, în splină și în ganglionii limfatici, unde în interval de o oră apar 25 — 35 de celule marcate fluorescent la 10^5 celule numărate. Studiul proprietăților lor a confirmat observația că timusul exportă o populație de celule heterogene. Cele mai multe (85 — 90%) au fenotip matur, în timp ce restul sînt imature și suferă un proces de maturare la periferie. Situația este complicată de faptul că fenotipul matur nu echivalează totdeauna cu starea de maturitate funcțională. În general însă, celulele denumite de Sollay și colab. (1980) emigrante recente din timus („Recent thymic migrants") sînt integral imunocompetente la cîteva ore după ce au părăsit acest organ.

2) **Celulele progenitoare posttimice.** Existența acestei categorii de celule este considerată necesară conceptual de către Stutman (1985), pe baza faptului că timusul nu exportă obligatoriu numai celule mature. Ea implică existența unui compartiment periferic în care are loc maturarea emigranților imaturi din timus. Procesul de maturare s-ar face în succesiunea: progenitori posttimici → precursori posttimici → celule efectoare (Miller și Stutman, 1984), asigurînd, în același timp, și expansiunea concomitentă a populației celulare respective.

In vivo, la șoarece, fiecare celulă progenitoare ar produce ~ 10 000 de celule precursoare T, în interval de 12 — 20 de săptămîni de la repopularea cu limfocite a unui șoarece lipsit de celule T. Rezultate aproximativ asemănătoare s-au obținut și *in vitro*.

3) **Celulele precursoare posttimice** ar fi prezente la șoarece în ficat după 17 zile de gestație și în perioada perinatală. La naștere sînt găsite în măduva oaselor și în splină, iar la adult, în măduvă și în țesuturile limfoide. Ele exprimă antigenele Lyt-1, 2, 3 și Thy-1. Nu au funcții imunologice detectabile. În prezența influențelor timusului sînt capabile să prolifereze extensiv (deși mai limitat decît celulele progenitoare) în organele lipsite de celule T și să producă celule T capabile să răspundă la aloantigene și la mitogeni. Existența lor explică menținerea constantă a populațiilor de celule T, datorită capacității de expansiune populațională extensivă, asociată cu maturarea funcțională.

Aceste date recente sînt în contradicţie cu cele mai vechi, unanim admise, după care singurele celule care pot obţine „viza de ieşire" din timus sînt cele care s-au maturat la stadiul de celule T, denumite, în mod obişnuit, celule emigrante virgine imunocompetente.

Modificări fenotipice ale suprafeţei celulelor T, corelate cu diferenţierea. În cursul trecerii lor din măduvă în cortexul timic şi pe măsură ce se deplasează spre regiunea medularei timice, celulele liniei T suferă o serie de procese de diferenţiere care se traduc prin dobîndirea unor funcţii specializate şi a unor markeri biochimici de suprafaţă. Aceştia includ: 1) receptori implicaţi în recunoaşterea unor antigene din mediu şi în interacţiuni celulare specifice şi 2) antigene membranare cu funcţii adesea necunoscute. Exprimate caracteristic în anumite etape ale diferenţierii celulelor T, aceste antigene sînt utilizate frecvent în studiile de ontogeneză, ca markeri pentru stadiul de diferenţiere al celulelor T. Markerii de suprafaţă celulară au fost descrişi iniţial la şoarece, în special după 14 zile în celulele timusului embrionar. Ulterior au fost descoperiţi şi analogii lor biochimici şi funcţionali exprimaţi pe celulele umane, ca de exemplu: 1) Lyt-1 murin = T 1-Leu uman; 2) Lyt-2 murin = T8 — Leu-2 uman; 3) Lyt-3 — T4 murin = T4 — Leu-3 uman ş.a.m.d. După Habu şi colab. (1980), exprimarea acestor antigene ar avea loc simultan, într-o anumită perioadă a dezvoltării intratimice a celulelor T. Ceredig şi colab. (1983) însă, aduc probe în favoarea unei asincronii şi / sau a unei apariţii secvenţiale a antigenelor pe suprafaţa timocitelor în cursul ontogenezei.

În funcţie de prezenţa sau de absenţa acestor markeri specifici ai suprafeţei celulare a devenit posibilă stabilirea fenotipului de suprafaţă a diferitelor subpopulaţii de limfocite T, care le caracterizează şi le deosebeşte de alte tipuri de celule. Fig. 105 prezintă succesiunea apariţiei şi modificărilor fenotipice ale celulelor din linia T, în cursul evoluţiei lor de la celula-stem din măduva oaselor la celulele din cortexul şi din medulara timusului, pînă la cele care trec în circulaţia periferică şi final în organele limfoide secundare.

Utilizînd „sonde" de anticorpi monoclonali, capabili să recunoască o singură glicoproteină membranară, Bolhuis, Gravekamp şi van de Griend (1986) consideră că procesul de diferenţiere a celulelor T are patru faze distincte. Celulele T cele mai timpurii exprimă, iniţial, numai antigenul T_{11} (CD2), care leagă hematiile de berbec. Timocitele comune (stadiul II) exprimă, în densităţi diferite, moleculele T6, T4 şi T8. Celulele $T11^+$ din stadiile I şi II, reprezentînd 10 şi respectiv 65% din toate timocitele, sînt localizate în cortextul timic. În cursul procesului de maturare, moleculele T6 dispar de pe suprafaţa celulelor. Maturarea finală (stadiul III) corespunde apariţiei moleculelor T3 şi dispariţiei, după caz, a antigenelor T4 sau T8.

Etapa timică, de la celula-stem pînă în momentul diseminării în circuitul sanguin, durează ~ 3 zile. Celulele din stadiul III sînt imunocompetente şi reprezintă ~ 30% din timocite. Ele sînt diseminate în compartimentele periferice, extratimice (stadiul IV), unde, după stimularea de către un antigen care interacţionează cu receptorul lor specific, exercită funcţii imunitare specifice; T inductor, T helper, T citolitic, T supresor.

Fenotipul de tip adult este atins în apropierea nașterii, cînd pot fi găsite în circulația periferică limfocite cu toate funcțiile T detectabile.

De menționat că la om, în momentul detectării lor la periferie, acestea se manifestă cu o intensitate comparabilă celor descrise la adulți, în timp ce la șoarece acest nivel este atins, cel mai adesea, numai după cîteva săptămîni.

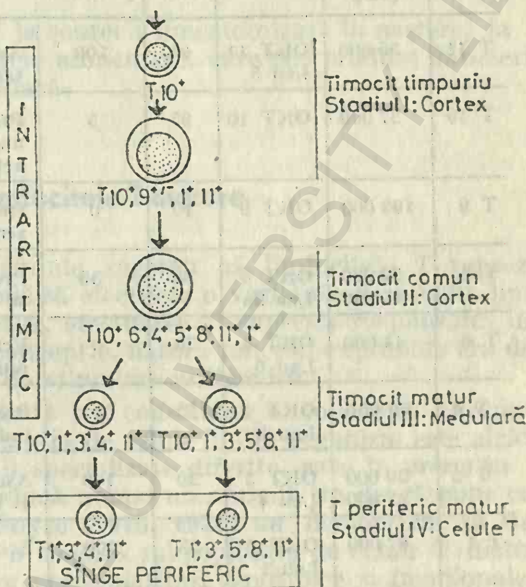


Fig. 105. — Stadiile de dezvoltare a celulelor T. Sînt menționate diferitele localizări tisulare unde au loc și modificările în structura markerilor de suprafață.

Faptul că prezența unor antigene din acest gen este strict corelată cu diferitele subclase funcționale de celule T (T_H, T_C, T_S), arată că „decizia" celulelor de a exprima un anumit marker echivalează cu o „angajare", în sensul îndeplinirii unei anumite funcții specifice. Un argument în sprijinul acestei concepții este furnizat și de faptul că celulele imature, studiate la cîteva ore după colonizarea timusului, sînt lipsite de acești markeri, care apar (iar unii dispar) în cursul procesului de maturare. Ca urmare, în practică există tendința de a echivala atît la șoarece, cît și la om, prezența diferitelor antigene de suprafață cu stadiile de dezvoltare ale celulelor, pentru a marca fie caracterul lor matur sau imatur, fie, implicit, anumite activități funcționale (tabelul nr. 36).

Stutman (1985), precum și Bolhuis și colab. (1986) sînt mai rezervați. Ei consideră, pe baza unor date experimentale, că acest mod de interpretare nu trebuie absolutizat. Semnificația funcțională a numărului mare de subpopulații de timocite este greu de stabilit și, cel mai adesea, nu se poate afirma cu precizie dacă un anumit antigen de suprafață marchează o linie celulară distinctă sau stadii diferite în evoluția aceleiași linii. Studiile cu ajutorul anticorpilor monoclonali au adus probe în sprijinul ideii că, uneori, este chiar periculos să atribui anumite proprietăți unei celule numai pe baza fenotipului de suprafață (Reichert și colab., 1984; Stutman, 1985).

Tabelul nr. 36

Antigenele de suprafaţă, utile pentru studiul diferenţierii şi funcţiei celulelor T umane (după Stobo, 1984)

Antigenul	Greutatea moleculară (dal)	Anticorpii monoclonali*	% pozitive		Alte particularităţi
			Timocite	Celule T periferice	
T 11	55 000	OKT 11 Leu 5	95	100	Asociat cu receptorul de rozetare a eritrocitelor
T 10	37 000	OKT 10	95	5	Prezent pe celulele-stem, pe unele celule B şi pe celulele T activate
T 9	190 000	OKT 9	10	0	Receptor de transferină ; prezent pe celulele T activate
T 8	32 000 43 000	OKT 8 Leu 2a	80	35	Prezent pe celulele T citotoxice şi T supresoare
T 6	44 000	OKT 6 Leu 6	70	0	Echivalent antigenului TL murin
T 4	60 000	OKT 4 Leu 3	75	65	Prezent pe celulele T helper/inductor
T 3	20 000 23 000	OKT 3 Leu 4	20	100	Asociat cu receptorul de antigen al celulei T
T 1	67 000	OKT 1 Leu 1	95	100	Echivalent antigenului Thy-1

* OKT se referă la nomenclatura anticorpilor monoclonali produsi de Ortho Diagnostics Systems, iar Leu la cei produşi de Beckon-Dickinson FACS Systems.

Markerul E(T 11/Leu 5). *Formarea de rozete.* Rozetele (engl. „Rosette") rezultă din gruparea caracteristică a eritrocitelor anumitor specii, consecutivă adeziunii lor de suprafaţa limfocitelor. Fenomenul poate fi produs prin mecanisme imune (în cazul hematiilor acoperite cu un antigen sau al hematiilor heterologe) sau neimune (spontane), prin interacţiunea unor determinanţi antigenici ai eritrocitelor cu anumiţi receptori limfocitari, diferiţi de cei implicaţi în recunoaşterea antigenelor.

Rozetele E (E de la eritrocit) sînt caracteristice interacţiunii dintre eritrocitele de oaie şi markerul E de pe limfocitele T umane. Natura şi specificitatea de legare a receptorului E cu hematiile nu sînt cunoscute. Este posibil că ar acţiona cu anumite glicoproteine sau glucide de pe suprafaţa hematiilor. Formarea rozetelor este favorizată de incubarea la 4°C şi este condiţionată de viabilitatea celulelor T (Celulele moarte sînt evidenţiate prin colorare cu albastru de tripan). Determinarea numărului de celule sanguine care formează rozete cu hematiile de oaie reprezintă modalitatea cea mai simplă pentru a număra limfocitele T la om. Proporţia acestora este de 90% în timus, 60 — 80% în sîngele periferic şi 20 — — 40% în splină (J. F. Bach, 1977).

Celulele „nule". După J. F. Bach (1977), 2 – 10% din limfocite sînt „nule" („Null cells") deoarece nu prezintă nici un marker, pe baza căruia ar putea fi etichetate ca limfocite T sau B. Proporția lor este variabilă în funcție de organele din care au fost izolate.

Celulele „nule" pot include celule de tip Killer (K) și precursori ai celulelor T și B, care nu exprimă încă markerii caracteristici. Ele posedă receptori Fc și sînt capabile de citotoxicitate față de celule-țintă acoperite de IgG.

Numărul lor este mărit la șoarecii timectomizați la naștere, la șoarecele „nud", ca și în carențele alimentare, care pot produce disocieri ale markerilor de suprafață celulară.

Limfocitele T mature

Primele date experimentale sugerau că limfocitele T reprezintă o populație uniformă, capabilă să efectueze o varietate de funcții imunologice, care induceau activarea, efectuarea și supresia răspunsului imun. În conformitate cu această concepție, natura funcției exprimate era determinată de tipul sau modul de stimulare antigenică.

Numeroase studii recente au consolidat o concepție alternativă, după care, în realitate, populația de celule T din organism este alcătuită dintr-o serie de subpopulații specializate diferite, care în prezența unui antigen sînt capabile să producă numai un anumit tip de răspuns caracteristic. Astfel, Cantor și Boyse (1975, 1976) au demonstrat că fiecare funcție este circumscrisă la o singură subpopulație de celule T distinctă, bine diferențiată, stabilă, cu particularități fenotipice și funcționale distincte. Identificarea, separarea și purificarea lor a devenit posibilă datorită deosebirilor constante între diferitele subpopulații specializate funcțional, în structura moleculelor glicoproteice, care acționează ca markeri biochimici pe suprafața lor. Ei au studiat exprimarea a trei glicoproteine de suprafață celulară pe limfocitele T de șoarece: Ly-1, codificată de o genă din cromosomul 19, și Ly-2 și Ly-3, codificate de două gene distincte, strîns linkate, de pe cromosomul 6. S-a demonstrat că la șoarece, în funcție de prezența sau de absența celor trei markeri biochimici, stocul de celule T periferice este alcătuit din trei subpopulații celulare distincte. Fiecare subpopulație exprimă un set de instrucțiuni genetice diferite și, ca o consecință, prezența celor trei glicoproteine membranare este în mod caracteristic diferită.

Celulele Ly-1⁺ reprezintă 30% din stocul de celule T periferice și sînt programate genetic să inducă proliferarea și/ sau diferențierea altor tipuri de celule. Aceste celule cu caracter de „helper" (T_H) induc celulele B să secrete anticorpi și stimulează monocitele, mastocitele și precursorii celulelor T să participe în răspunsul imun mediat celular.

Celulele Ly-2⁺3⁺ reprezintă ~ 10% din populația de celule T periferice și sînt programate genetic să omoare (T_C) sau să supreseze alte celule (T_S) (Cantor și colab., 1976, 1984).

Experimental s-a demonstrat că celulele Ly-1^+ 2^- şi Ly-2^+3^+, care au dobîndit opţiunile respective, aparţin unor linii de diferenţiere celulară diferite şi nu sînt stadii secvenţiale ale unei singure linii de evoluţie. Ca urmare, ele sînt stabile şi nu sînt capabile de interconversie.

Populaţia cea mai numeroasă de celule T poartă fenotipul *Ly-1⁺2⁺3⁺* şi este cel mai puţin bine definită. Ea reprezintă 50% din celulele periferice (10% sînt celule lipsite de orice marker, respectiv celule „nule") şi a fost descrisă sub denumirea de celule reactive (sau sensibile) la antigene ARC („*A*ntigen *r*eactive T *c*ells"). Ele reprezintă, după Cantor (1984), o rezervă de celule intermediare, lipsită de o funcţie imunologică directă, dar care pot evolua spre celule Ly-1^+ şi Ly-2^+3^+ mature. După stimulare continuă *in vitro*, cu antigene convenţionale sau cu mediatori din categoria „factorilor de creştere" imunitari, celulele ARC pot da naştere fie la celule Ly-2^+3^+ (Nagy şi colab., 1981), care pot manifesta 90 — 100% din activitatea citolitică sau supresoare, fie la celule Ly-1^+, cu caracter de celule T_H (Shen şi colab., 1980). Aceste date sugerează că dobîndirea funcţiilor de celule citolitice sau inductoare mature s-ar realiza prin pierderea progresivă a markerului glicoproteic Ly-1 sau respectiv Ly-2 3 de la celulele precursoare Ly-$1^+2^+3^+$.

Pe criterii asemănătoare, subpopulaţiile de celule T mature au fost grupate în două mari categorii, funcţional distincte:

1) Celule cu funcţii de reglare: T ajutătoare (T helper T_H), T amplificatoare (T_A) şi T supresoare (T_S).

2) Celule cu funcţii efectoare: T citotoxice (T_C) sau, după o denumire folosită frecvent în ultimii ani, T citolitice (T_{CL}) şi celulele T_{DH} cu rol în fenomenele de hipersensibilitate (fig. 106).

Acestor subpopulaţii, unii cercetători le adaugă celulele T inductoare (T_I), cu funcţii cel puţin parţial suprapuse celulelor T_H.

Clasificarea este relativ rigidă şi uneori nu corespunde realităţii. Astfel, celulele T_A, T_D şi T_I pot avea, pe lîngă funcţiile de reglare şi funcţii efectoare. Celulele T_S sînt, la rîndul lor, supuse unui sistem de reglare negativă, reprezentat de celulele T contrasupresor, care au capacitatea de a elibera limfocitele B de sub reglarea negativă a celulelor T_S. În sfîrşit, Gershon şi colab. (1976) au descris sub denumirea de hermafrocite („Hermaphrocyte") celule T cu funcţii mixte, supresor/helper („Supressor — helper T cell"). Hood şi colab. (1984) prezintă o clasificare puţin diferită, incluzînd în grupa celulelor helper celulele T_A, T_{H-B} şi T_{H-S}, iar în cea a celulelor imunitare T_C (T_{CL}), T_D şi T_S (fig. 107).

Caracterizarea generală a principalelor subpopulaţii funcţionale de celule T

Studiul corelaţiilor dintre particularităţile fenotipice şi cele funcţionale ale celulelor T periferice a demonstrat posibilitatea subdivizării lor, în funcţie de exprimarea antigenelor T4 şi T8, în două subpopulaţii celulare, funcţional mutual exclusive.

Fig. 106. — Funcțiile principalelor subpopulații de celule T (după Astaldi și colab., 1980).

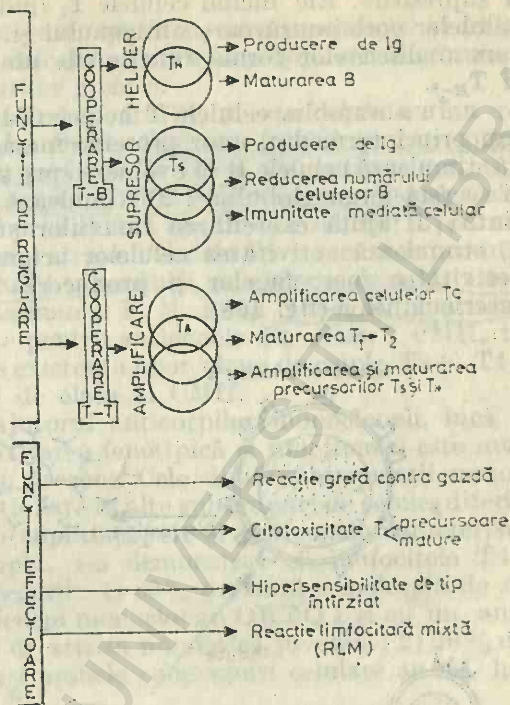
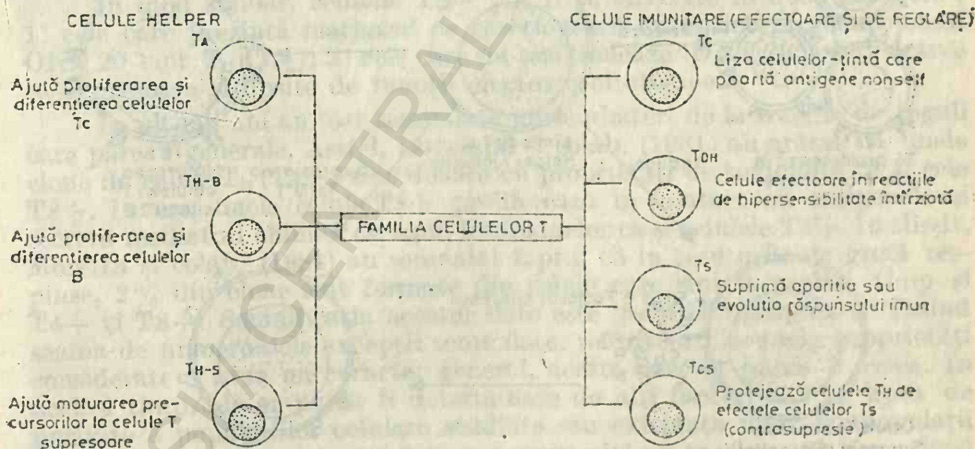


Fig. 107. — Familia celulelor T (modificat după Hood și colab., 1984).



Celulele T4 +

Reprezintă ~ 65% din celulele T și au un rol esențial în reglarea reactivității imune, respectiv în stimularea apariției plasmocitelor care secretă anticorpi, ca și în activarea celulelor efectoare (T citotoxice) și a celor

T supresoare. Ele includ celulele T_I (inductoare, care favorizează selecţia celulelor corespunzătoare antigenului şi declanşarea procesului de maturare a diferitelor forme funcţionale ale celulelor T), celulele T_A, T_{H-B} şi T_{H-S}.

În ansamblu, celulele T helper (T4+), acţionînd prin contact direct sau prin intermediul unor proteine mesager, exercită următoarele efecte : 1) stimulează celulele B să evolueze spre stadiul de plasmocit, care produce şi secretă imunoglobuline ; 2) stimulează celulele T_C să distrugă celulele-ţintă ; 3) ajută exercitarea funcţiilor supresoare de către celulele T_S ; 4) stimulează activitatea celulelor ucigaşe naturale, NK ; 5) potenţează activitatea macrofagelor şi producerea mediatorilor specifici de tipul interleukinelor (fig. 108).

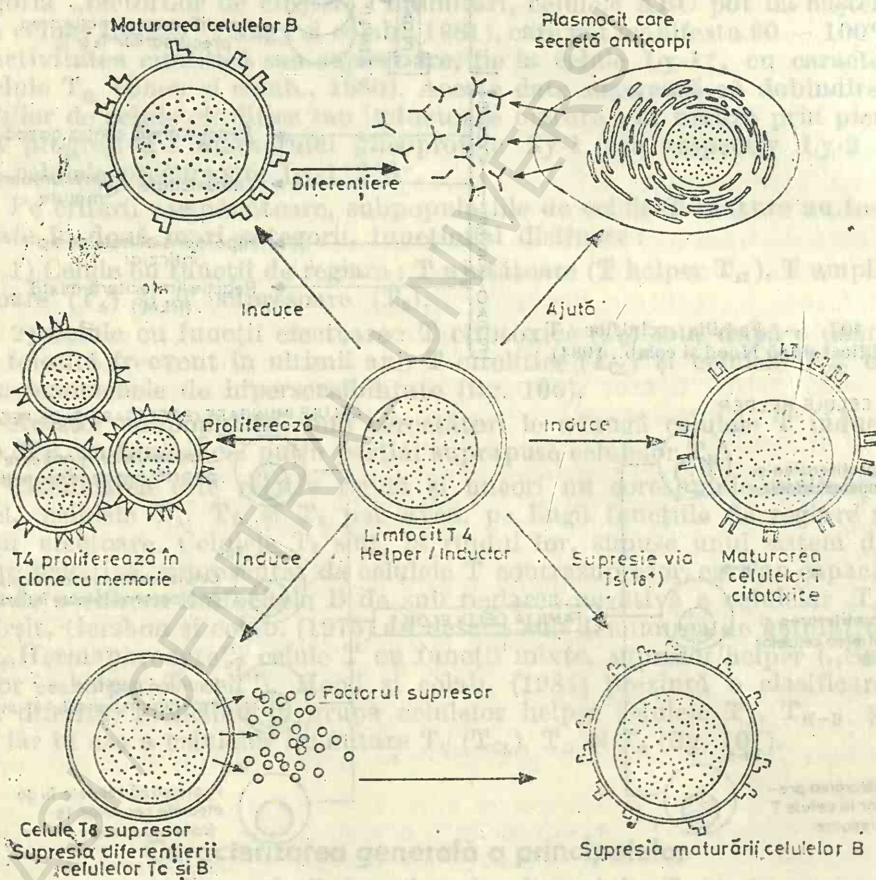


Fig. 108. — Rolul central al celulelor T_H în evoluţia răspunsului imun (după Gallo, 1989).

Celulele T8 +

Includ celule cu rol citotoxic sau citolitic (T_C sau T_{CL}) şi celule cu funcţii de reglare T_S.

Celulele Tc (T_{CL}). După activare specifică, aceste celule își exercită funcția de distrugere a celulelor infectate cu virusuri și a celulelor tumorale, ca și de respingere a țesuturilor grefate.

Celulele T_S. Descrise de Gershon (1970), aceste celule au un rol esențial în modularea răspunsului imun, limitînd gradul în care organismul-gazdă răspunde, după stimularea de către un antigen dat, atît în reacțiile imunitare mediate celular, cît și în cele mediate umoral. Celulele T8+ și T4+ se deosebesc și prin natura produselor self CMH pe care îi recunosc, în asociere cu antigenul străin. Celulele T8+ recunosc produșii genelor de clasa I CMH, iar cele T4+ produșii genelor de clasa II. Corelația nu este însă absolută. Strassman și F. M. Bach (1984) au identificat celule T8— T4+ cu specificitate pentru antigenele din clasa I CMH, iar Spits și colab. (1985) au descris existența unor clone de celule T8+ T4— cu specificitate pentru produșii de clasa II CMH.

Cercetările efectuate cu ajutorul anticorpilor monoclonali, încă în curs, arată că, probabil, complexitatea fenotipică și funcțională este mult mai mare decît cea cunoscută în prezent. Cele două subpopulații majore T4+ și T8+ pot fi probabil fracționate în alte subgrupuri de celule, diferite atît prin natura moleculelor de suprafață, cît și prin unele caracteristic funcționale. Astfel, spre exemplu, s-a demonstrat că limfocitele T4+ (T_H) pot fi grupate în două categorii : 1) 80% prezintă o moleculă de suprafață ușor detectabilă cu anticorpi monoclonali OKT Q 1 și cu un anticorp prezent în serul bolnavilor de artrită reumatică juvenilă ; 2) 20% din celule nu au acești markeri. Deși ambele subgrupuri celulare au rol helper, numai cea de-a doua este T_{H-S}.

În mod similar, celulele T8+ pot fi subdivizate în două categorii : 1) cele care prezintă markerul ce reacționează cu anticorpi monoclonali OKT 20 sînt T_C (T_{CL}); 2) cele care nu reacționează (OKT 20^-) sînt active ca supresoare și lipsite de funcții efectoare citotoxice.

În ultimii ani au fost semnalate unele abateri de la o serie de reguli care păreau generale. Astfel, Loveland și colab. (1981) au arătat că unele clone de celule T_H (T4+) sînt dotate cu proprietăți de toxicitate ca și cele T8+. Invers, unele celule T8+ proliferează în contact cu antigenele și secretă mediatori chimici de tipul limfokinelor ca și celulele T4+. În sfîrșit, Moretta și colab. (1984) au semnalat faptul că în țesuturile de grefă respinse, 2% din clone sînt formate din celule care sînt în același timp și T4+ și T8+. Semnificația acestor date este greu de interpretat. Ținînd seama de numeroasele excepții semnalate, referitoare la unele proprietăți considerate a avea un caracter general, aceste date ar putea fi reale. În același timp, ele ar putea fi determinate de alți factori ca : 1) lipsa de puritate a populațiilor celulare studiate sau existența unor subpopulații contaminante, care nu pot fi detectate prin nici un marker ; 2) lipsa unei concordanțe perfecte între fenotipul și funcția celulei ; 3) starea imunitară a organismului-receptor.

Limfocitele T_A

Reprezintă o subpopulație de limfocite mici, avînd rol ajutător (helper), de amplificare („Amplifying T cell") a diferențierii și proliferării celulelor T killer. Ca și celulele T_H sînt stimulate de interacțiunea

cu celulele care „prezintă" antigenele, suferind o activare generală de tipul transformării blastice (mărirea volumului celule și nucleului, apariția microtubulilor și polisomilor, mărirea vitezei de sinteză a compușilor macromoleculari). Ca și limfocitele T_H, celulele T_A recunosc antigenele străine numai în asociere cu moleculele Ia (D sau K) CMH și sînt supuse restricției CMH. Interacțiunea repetată cu antigenele determină proliferarea și diferențierea la forme efectoare, care secretă IL-2 și alte limfokine, ce stimulează maturarea celulelor T_C efectoare.

În felul acesta, celulele T_A au un rol esențial în dezvoltarea imunității mediate celular (antivirală și antitumorală).

Limfocitele T_{DH}

Reprezintă o subpopulație aparte de celule T, care participă, în principal, la unele reacții de hipersensibilitate întîrziată („Delayed hypersensitivity reaction"), de la care și-au luat și denumirea. Considerate de unii autori ca avînd funcții helper, alături de celulele T_H și T_A, limfocitele T_{DH} (sau T_D) au capacitatea de a recruta macrofagele, de a delimita situsul de infecție, asigurînd menținerea antigenului la locul de pătrundere în organism.

Celulele T_{DH} mature recunosc antigenele străine în asociere cu antigenele self Ia CMH de pe suprafața celulelor care „prezintă" antigenele la nivelul organelor limfoide. După activare și transformare blastică, ele suferă procesele uzuale de proliferare și diferențiere, pentru a deveni celule T_{DH} efectoare, care ajung pe calea circuitului sanguin în situsurile periferice de depunere a antigenelor.

Ele ar participa în respingerea grefelor și în producerea unui răspuns inflamator de tip hipersensibilitate întîrziată în piele, după recunoașterea prezenței antigenelor pe suprafața celulelor Langerhans.

În ansamblu, celulele T mature periferice îndeplinesc o gamă largă de funcții specializate, care au fost detectate experimental:

1) recunosc substanțele străine (nonself);

2) sînt activate și proliferează după stimularea de către antigene solubile sau de pe suprafața celulelor;

3) produc mediatori solubili (limfokine);

4) dezvoltă funcții citotoxice (citolitice sau Killer);

5) exercită funcții specifice de reglare a interacțiunilor celulare (celulele helper și supresor);

6) produc o serie de efecte importante pentru apărarea organismului, ca: activitatea citotoxică mediată celular, acțiunea antivirală, efectele antifungice, respingerea transplantelor de țesuturi etc., cunoscute sub denumirea de reacții de imunitate mediată celular.

Datorită constituenților membranari care mediază contactele intercelulare ele sînt capabile de interacțiuni moleculare cooperante complexe, esențiale pentru evoluția unui răspuns imun eficient. În același timp, celulele T pot să „citească" variațiile gradientelor de interleukine (citokine) difuzibile, să asigure transducția intracelulară a semnalelor, să răs-

pundă la ele prin reactivitate imună crescută sau scăzută și, ceva mai mult, să-și regleze propriile lor funcții, printr-o cale autocrină, răspunzînd la propriile lor citokine.

Moleculele suprafeței celulelor T implicate în activare

În ultimii ani au fost identificate, cu ajutorul anticorpilor monoclonali, o serie de molecule de suprafață implicate în activarea celulelor T și în recunoașterea antigenului. În prezent, ele sînt relativ puțin cunoscute. În plus, există o mare confuzie din cauza denumirilor multiple atribuite aceleiași structuri.

Complexul molecular CD3 sau T3, identificat serologic pe celulele T umane, are un echivalent și pe celulele T de la șoarece (probabil Thy-1, cu care este înrudit). După Fitch (1986), la om ar fi format din cel puțin trei polipeptide distincte: γ (g.m. 25—28 kdal), δ (g.m. $\sim$20 kdal) și ϵ (g.m. $\sim$20 kdal). Catenele γ și δ sînt glicoproteine, în timp ce în lanțul ϵ nu au fost evidențiate oligozaharide. Clonarea genei δ a complexului CD3 uman a demonstrat că ea codifică un polipeptid de 171 aminoacizi, care conține o secvență-semnal, un domeniu extracelular (79 AA), o regiune transmembranară și un domeniu intracelular (44 AA). Catena δ nu prezintă nici o omologie cu peptidele receptorului T, cu Ig sau cu genele CMH.

Complexul CD3 caracterizează celulele T umane mature (timice și periferice) și poate fi identificat cu ajutorul anticorpilor monoclonali OKT3, UCHT1 și Leu-4. El este asociat fizic intim cu receptorul de antigen al celulelor T, dar nu este legat covalent de acesta. Exprimarea lor concomitentă este obligatorie.

Rolul său este puțin cunoscut. Datele existente pledează pentru ideea că ar juca un rol major în transducția transmembranară a semnalului inițiat de legarea antigenului de receptorul Ti.

Structurile de suprafață T4 (CD4) și T8 (CD8). Identificate inițial la șoarece, structurile de suprafață CD4 (T4) și CD8 (T8) sînt prezente pe suprafața unor subpopulații de celule T, cu funcții unice de reglare sau efectoare și prin aceasta mutual exclusive. Ambele tipuri de structuri au caracterul de proteine membranare integrate și prezintă omologie, de structură și de secvență a aminoacizilor, cu membrii familiei de supergene pentru Ig (care include antigenele de clasele I și II CMH, β_2-microglobulina, antigenul Thy-1 etc.). Sînt formate din patru domenii, dintre care două sînt extracelulare (cel N-terminal este asemănător unei regiuni variabile), o regiune transmembranară omologă celei corespunzătoare din catenele β de clasa II CMH și un domeniu intracitoplasmatic.

Structurile CD4 (T4) sînt definite de anticorpii monoclonali OKT4 și Leu-3 și sînt prezente pe 50—65% din celulele T periferice. Au $\sim$55 kdal și sînt întîlnite fie ca structuri membranare izolate, fie asociate prin interacțiuni necovalente cu alte molecule de suprafață. Nu formează

dimeri. Celulele T4+T8— exercită efecte helper/inductor (T_H), cooperînd în inducția răspunsului imun prin interacțiuni celulare de tipul T — T, T — B și T — macrofag. Structurile de suprafață T4 funcționează și ca receptori specifici pentru virusul HIV („Human immunodeficiency virus"), care determină SIDA, fapt ce explică infectarea selectivă a celulelor T4+ (T_H). Prezența lor a fost evidențiată, de asemenea, pe macrofage și pe neuroni. Macrofagele infectate supraviețuiesc și au un rol important în vehicularea virusului în organism și în transmiterea infecției prin fuziune cu diferite celule sănătoase. Este probabil că ele străbat bariera hematoencefalică și transportă virusul și în creier. Infectarea neuronilor explică apariția semnelor neurologice și psihopatologice ale bolii.

Structurile CD8 (T8), definite cu ajutorul anticorpilor monoclonali OKT8 și Leu 2 au o structură mai complicată, fiind prezente sub formă de homodimeri sau homomultimeri pe 20—30% din celulele T periferice. Celulele T8+T4— au funcții citolitice (T_C sau T_{CL}) specifice pentru antigene și supersoare (T_S).

Rolul structurilor T4 și T8. După cum remarcă Bolhuis și colab. (1986), pe lîngă asocierea semnificativă dintre experimarea antigenelor T4 și T8 și anumite funcții specifice ale celulelor purtătoare, există o strînsă corelație între prezența lor și structurile de pe suprafața celulelor-țintă. Astfel, cele mai multe celule T8+clonate recunosc aproape exclusiv antigenele CMH de clasa I și lizează celulele-țintă purtătoare. Celulele T4+(T_H) recunosc antigenele-self de clasa II CMH și sînt supuse restricției exercitate de acestea.

Preferința limfocitelor care poartă structurile T8 și T4 pentru anumite antigene CMH poate fi demonstrată prin inhibarea activității lor, cu ajutorul anticorpilor monoclonali anticlasa I (HLA—A, B) și respectiv anti-DR, DC, DQ, din clasa II CMH). Aceste date ilustrează implicarea funcțională a antigenelor T4 și T8 în recunoașterea celulei-țintă. Funcționînd ca molecule de recunoaștere asociată („Associative recognition"), antigenele T4 și T8 au mai degrabă rolul de a mări aviditatea globală a reacției dintre celulele T și cele care prezintă antigenul decît cel direct de recunoaștere a antigenelor specifice (Fitch, 1986).

Inițial, s-a considerat că exprimarea structurilor T4 și T8 ar fi corelată numai cu funcția celulelor purtătoare. După Rayfield (1985), corelația su antigenele corespunzătoare din clasele I și II CMH este mult mai strînsă, acestea acționînd ca elemente de restricție ale funcției celulelor respective.

După Götze și Burger (1986), antigenele T4 și T8 ar media legarea laxă a celulelor T de celulele-țintă, prin interacțiune cu produșii genelor CMH de clasa II și respectiv clasa I. Acest contact intercelular inițial poate stimula un contact mai stabil, realizat prin interacțiunea specifică cu receptorul T, urmat de activarea celulelor T. Proteinele T4 și T8 nu prezintă heterogenitate structurală și, ca urmare, nu contribuie la specificitatea celulelor T față de antigene.

Structura de suprafață CD2 (T 11) reprezintă primul marker ce apare pe celulele T umane în ontogenie. La om, are structura unui peptid de ~50 kdal, cu rol de receptor pentru hematiile de oaie. Poate fi impli-

cat în activarea celulelor T, dar și în procesele asociate cu recunoașterea antigenelor.

Complexul molecular LFA-1, „antigenul-1 asociat cu funcția limfocitelor" („Lymphocyte function-associated antigen") este larg răspîndit, fiind prezent pe celulele T, B, granulocite, monocite și o parte din celulele medulare. Este constituit din două subunități peptidice : α($\sim$117 kdal) și β ($\sim$95 kdal), nelegate covalent.

LFA-1 nu pare să fie implicat direct în recunoașt erea celulei-țintă (Gromkowski și colab., 1984), dar ar participa în mărirea adeziunii celulelor T citolitice de celulele-țintă, în general, în interacțiunile dintre celulele T și B și dintre celulele T și celulele care „prezintă" antigenele (Fitch, 1986). El face parte dintr-o familie de molecule de suprafață, structural înrudite, dintre care LFA-3, spre exemplu, a fost evidențiat în toate celulele cercetate (leucocite, fibroblaști, endotelii vasculare, celule musculare netede etc.).

Tabelul nr. 37 prezintă sintetic principalele caracteristici și funcții ale moleculelor de pe suprafața celulelor T implicate în activarea lor.

Receptorul de antigen T

Cîteva motive obiective au creat dificultăți în izolarea și identificarea receptorilor T :

1) Ei au o structură complexă, insolubilă în apă în absența detergenților, datorită legăturii ferme de membrana celulară. În plus, nu sînt produși decît în cantități foarte mici în comparație cu receptorii membranari de natură imunoglobulinică.

2) Activarea celulelor T este un proces foarte complex, deoarece ele reacționează direct cu antigenele numai în mod cu totul excepțional.

3) Celulele T recunosc numai un complex format din asocierea antigenului corespunzător și o moleculă codificată de complexul major de histocompatibilitate (CMH). Datorită acestui fapt, celulele care „prezintă" antigenele trebuie să exprime pe suprafața lor glicoproteine codificate de CMH, respectiv molecule din clasa II pentru celulele T_H și din clasa I pentru celulele T_C.

4) Răspunsul celulelor T nu poate fi recunoscut decît prin efectele interacțiunii cu antigenul : proliferare, secreție de limfokine, citoliza celulelor-țintă care poartă antigenul specific.

5) Răspunsul implică o serie de interacțiuni celulare complexe cu celulele care prezintă antigenele, cu macrofagele, cu celulele B, T_H, T_C etc.

6) Numărul mic al celulelor face dificilă analiza biochimică a proceselor asociate acestui răspuns (Fitch, 1986).

7) În sfîrșit, o altă dificultate majoră derivă din faptul că, în stare naturală, receptorul T este asociat cu proteinele CD3 care, deși nu afec-

Tabelul nr. 37

Moleculele de pe suprafaţa celulelor T, cu excepţia receptorului Ti implicate în activarea acestor celule (după Fitch, 1986)

Moleculele*	Caracteristicile	Funcţia	Alte date
CD3** (T3/Leu4) [?]	Lanţul γ (25 — 28 kdal) Lanţul δ(8 — 20 kdal) Lanţul ε(~20 kdal) Altele?	Semnal de transducţie (?)***	Asociat cu lanţul β al RCT
CD4 (T4/Leu3) [L3T4]	Peptid (55 kdal)	Recunoaşterea moleculelor de clasa II CMH	Omologie cu Ig
CD8 (T8/Leu2) [Lyt-2]	Peptid (~34 kdal) (pe celulele T periferice, ca homomultimere; în timus, ca heteromultimere (cu T6, peptid ~ 46 kdal)	Recunoaşterea moleculelor de clasa I CMH	Omologie cu Ig
CD2 (T11, Leu 5, LFA-2)[?]	Peptid (~50 kdal)	Trei epitopi: T 11_1 leagă eritrocitele de oaie; $T11_2$(?); $T11_3$ neoepitop pe celulele activate(?)	—
LFA-1 [LFA-1]	Lanţul α(~177 kdal); Lanţul β(~ 95 kdal)	Recunoaştere asociată	—
MAC-1(mo-1, OKM-1) [MAC—1]	Lanţul α(~165 kdal); Lanţul β(~ 95 kdal)	CR3	Membru al familiei LFA-1
„Al treilea membru" [?]	Lanţul α(~150 kdal); Lanţul β(~ 95 kdal)	C34(?)	Membru al familiei LFA-1
T44[?]	Homodimer legat disulfidic (~44 kdal)	(?)	—
Receptor IL-2(TAC) [Receptor IL-2]	~55 kdal	Receptor pentru IL-2	—
Receptor de transferină [Receptor transferină]	~100 kdal	Receptor pentru transferină	Prezent pe mai multe tipuri de celule activate

* În paranteze, denumirile structurilor umane determinate cu anticorpi monoclonali; în paranteze drepte, denumirile omologilor murini, atunci cînd sînt cunoscuţi.

** CD — („Cluster of differentiation") — nomenclatură aprobată de Organizaţia Mondială a Sănătăţii pentru desemnarea grupurilor de markeri de diferenţiere ai leucocitelor umane pe baza studiilor biochimice, serologice şi genetice. Terminologia este menită să înlocuiască denumirile anterioare atribuite markerilor limfocitelor T, cu următorele echivalenţe: CD1 = = T6 (marker de diferenţiere a timocitelor); CD2 = T11 (receptorul celulelor T pentru eritrocitele de oaie); CD3 = T3 (complexul molecular asociat cu receptorul de antigen al celulelor T); CD4 = T4 (L3T4) (markerul subpopulaţiei de celule T helper; CD5 = T1 (marker al celulei T); CD6 = receptorul pentru Fc μ al celulei T; CD7 = marker al celulei T; CD8 = = T8 (Ly-2, 3, la şoarece) = markerul subpopulaţiilor de celule T_c/T_s; CD25 = TAC—receptorul de IL-2 al celulei T activate.

*** Semnele de întrebare = date incerte sau lipsă de date.

tează capacitatea receptorului T de a fi recunoscut de moleculele de anticorpi, pot controla într-o modalitate subtilă capacitatea lui de a lega antigenele CMH (Marrack și Kappler, 1987).

Cîteva inovații tehnice au facilitat totuși studiul receptorului T și anume :

1) posibilitatea obținerii unor populații de celule T, provenite din limfoame cu celule T sau de celule T clonate în prezența IL-2 și propagarea lor în culturi ;

2) obținerea de linii celulare de hibridom avînd specificitate pentru un singur antigen ;

3) producerea de anticorpi monoclonali față de moleculele antigenice specifice acestor celule ;

4) posibilitatea examinării structurii genetice cu ajutorul sondelor de ADNc.

Ca urmare, Haskins și colab. (1983, precum și Meuer și colab. (1983) au reușit, utilizînd anticorpi monoclonali față de un hibridom T de șoarece și respectiv față de o clonă de celule T umane, să precipite o structură chimică cu g.m. ~ 90 kdal, heterodimeră, formată din două catene diferite, α și β, considerată în prezent ca fiind corespunzătoare receptorului T „clasic".

Structura moleculară a receptorului de antigen al celulelor T. Izolarea, identificarea și caracterizarea moleculară a receptorului de antigen al celulelor T (RCT) au fost efectuate de Kappler și colab. (1983), care au izolat un heterodimer ce conținea legături S—S, ce eliberează, după reducere, o catenă acidă și o catenă bazică. El a fost denumit receptorul Ti („T idiotype").

Catena α are o g.m.de ~ 50 kdal și este alcătuită din 248 de aminoacizi, care formează un domeniu variabil (Vα) NH_2-terminal, un domeniu constant (Cα), o regiune transmembranară de 23 de aminoacizi și o „coadă" intracitoplasmatică de patru aminoacizi (fig. 109).

Catena β are o g.m. de ~40 kdal (respectiv 282 de aminoacizi) și o structură similară, fiind formată tot din patru segmente Vβ, Cβ, transmembranar și o „coadă" citoplasmatică.

Receptorii T formează o clasă de molecule de recunoaștere avînd o structură și o origine evolutivă asemănătoare imunoglobulinelor-anticorp, precum și un mecanism genetic similar pentru producerea diversității lor. Modul lor de intervenție este mai complicat decît al altor tipuri de receptori, deoarece recunosc substanțele străine (nonself) numai dacă sînt prezentate în asociere cu markerii celulari de self (proteinele CMH).

Bazele genetice ale diversității receptorului T. În ultimii ani au fost întreprinse numeroase studii pe celule umane și de șoarece, pentru a explica marea diversitate și repertoriul imens de specificități al receptorilor celulelor T (RCT) la un singur organism. Au fost izolate succesiv trei tipuri de gene, notate β, γ și α, în structura cărora au fost evidențiate regiuni variabile (V), de diversitate (D), de legare (J) și constante (C), asemănătoare, dar nu identice, celor descrise în cazul Ig (fig. 110).

Localizarea cromosomală a genelor RCT. Cu excepţia genelor pentru catena α a RCT, care, la om, sînt situate pe acelaşi cromosom (nr. 14) ca şi genele catenei H a Ig, celelalte gene ce codifică structurile RCT sînt situate pe cromosomi diferiţi (tabelul nr. 38).

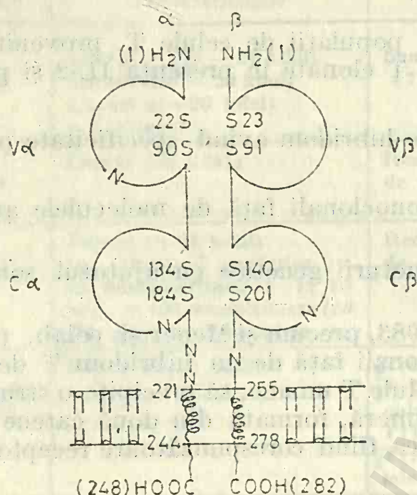


Fig. 109. — Reprezentare schematică a structurii receptorului celulelor T, bazată pe date de biochimie şi de clonare a ADNc (după John şi Owen, 1985).

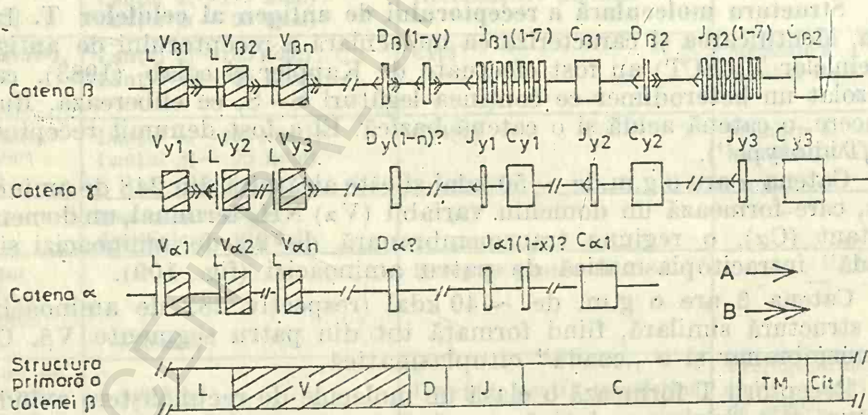


Fig. 110. — Structura probabilă a genelor pentru catenele α, β şi γ şi structura primară a catenei β: L — secvenţă „leader". A. Secvenţă heptamer — nonamer separată de un distanţier de 12 pb, B. Secvenţă heptamer — nonamer separată de un distanţier de 23 pb (după John şi Owen, 1987).

După Fitch (1986), localizarea genelor pentru Ig (receptori ai celulelor B) şi a celor pentru RCT pe cromosomi diferiţi nu este fortuită. Prezenţa a două familii de gene înrudite, dar încă insuficient de divergente, pe acelaşi cromosom ar prezenta riscul unor fenomene de crossing-over cu efect dăunător.

Apariţia receptorului Ti are loc în ontogenia timică. Samelson şi colab. (1985) au arătat că în celulele precursor „angajate" denumite de ei

celule pro-T, genele pentru catenele α și β apar complet „nearanjate". Procesul de „rearanjare" genetică ce stă la baza diversității receptorului Ti începe odată cu evoluția spre stadiul de celulă pre-T, în ordinea genelor γ, β și final α (fig. 111).

Tabelul nr. 38

Localizarea cromosomală a genelor RCT, MHC și a altor molecule de suprafață (după Fitch, 1986)

Genele		Localizarea în cromosom	
		om	șoarece
Receptorul Ti			
Lanțul α		14q11–q12	14
Lanțul β		7q32–q36	6
Lanțul γ		7p15	13
CMH		6	17
ALTE MOLECULE DE SUPRAFAȚĂ CELULARĂ			
UMANE	MURINE		
CD3 δ	T38	11q23–1qter	9
CD4	L3T4	?	?
CD8	Lyt-2,3	2p13	6
CD2	?	?	?
CD1	?	?	?
Thy-1	Thy-1	11q23–q24	9
LFA-1	LFA-1	?	?
IMUNOGLOBULINE			
Lanțul greu		14	12
Lanțul ușor k		2	6
Lanțul ușor λ		22	16

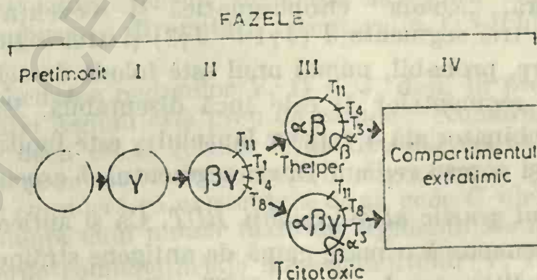


Fig. 111. — Stadiile ontogeniei normale a celulelor T. Simbolurile din interiorul celulelor marchează etapele de activare a genelor α, β și γ la nivelul transcrierii, ca o funcție a procesului de diferențiere a celulelor T (după Bolhuis, Gravekamp și van de Griend, 1986).

Și la om, exprimarea catenei β precede pe cea a catenei α, iar apariția RCT are loc simultan cu cea a complexului CD3.

Organizarea genelor receptorului Ti. Genele catenei β sînt alcătuite din 4 regiuni, corespunzătoare segmentelor V,D,J și C, cărora li se adaugă o secvență α „leader" 5' (vezi fig. 110).

• Regiunea C conține două segmente, notate Cβ1 și Cβ2, cu secvențe asemănătoare, dar totuși distincte. Are patru exoni, separați de introni cu lungime identică, localizați exact în aceleași poziții, ca și în genele pentru Ig. Exonii codifică domeniul extern și regiunile „balama", transmembranară și coada citoplasmatică.

• Regiunea J (engl. „Joining") este alcătuită din două grupuri de minigene, Jβ1 și Jβ2, care conțin, fiecare, cîte 7 segmente, dintre care 6 sînt active, iar unul o pseudogenă.

• Regiunile D, al căror număr nu este definit (Dβ(1—y)), sînt alcătuite dintr-o secvență de opt nucleotide, situate în poziție 5' față de regiunile J. După Davis și Hood (1984), fiecare segment D poate fi „citit" în trei cadre de citire diferite.

• Regiunile V („variabile") ar avea un repertoriu mai limitat decît în cazul Ig. Numărul lor ar fi mai mic de 30, iar după unii cercetători aproximativ 15.

• Genele lanțului α prezintă o secvență corespunzătoare regiunilor „leader" (L), variabile (V), J, constante, transmembranare și intracitoplasmatice. Au o singură regiune C (Cα1), formată din patru exoni, care codifică: 1) domeniul C, de 87 de aminoacizi; 2) regiunea scurtă, cu mărime similară, dar neomologă regiunii „balama" a Ig; 3) domeniul transmembranar și „coada"; 4) o regiune 3', netradusă. Probabil că numărul segmentelor J este foarte mare, dar pînă în prezent au fost identificate numai 18. Segmentele V α formează cel puțin 10 subfamilii, avînd, fiecare, între 1 și 10 membri. Există probabil și un segment D.

• Genele lanțului γ reprezintă a treia clasă de gene specifice pentru RTi, care suferă rearanjări. Ele codifică un peptid receptor, similar Ig, dar rolul, natura și funcția acestuia sînt încă necunoscute. Genele γ au trei regiuni C, fiecare formată din trei exoni, care codifică segmentul C, o regiune similară regiunii „balama" (care conține cisteină), o regiune transmembranară, „coada" citoplasmatică și secvența 3', netradusă. Genele γ conțin trei segmente J (Jγ1 — Jγ3) și trei segmente (Vγ1 — Vγ3), dintre care, probabil, numai unul este folosit de celulele T funcționale. Prezența segmentelor D este încă discutabilă. Este probabil că diversitatea combinatorială a genelor lanțului γ este limitată la utilizarea unei regiuni V și a unei regiuni D, cu segmentul J asociat.

Mecanismul genetic al diversității RCT. Ca și anticorpii, receptorul Ti trebuie să recunoască o mare gamă de antigene străine. Pentru a realiza această condiție, genele pentru RCT utilizează, cu unele diferențe, aceeași strategie folosită pentru producerea moleculelor de Ig. Ca urmare, apariția unor gene funcționale care codifică RCT în celulele T_H și T_C, analizată amănunțit în cazul catenei β, implică rearanjarea și juxtapoziția celor patru segmente separate Vβ, Dβ, Jβ și Cβ. Procesul de recom-

binare are loc între secvențele omologe celor de la Ig*, păstrate pe partea 3′ a segmentului Vβ, pe părțile 5′ și 3′ ale segmentelor Dβ și pe partea 5′ a segmentelor Jβ (Mallissen și colab., 1984). În timp ce în cazul genelor pentru catena H a Ig (vezi cap. „Bazele genetice ale diversității anticorpilor"), aranjarea secvențelor de recunoaștere permite numai legarea $D_H - V_H$ și $V_H - D_H$, în cazul genelor catenei β a RCT, datorită poziției secvențelor de recunoaștere, rearanjările sînt mai versatile. În acest fel, există mai multe posibilități de recombinare a segmentelor de gene, ca, de exemplu, legarea directă Vβ – Jβ, Dβ – Dβ, Vβ – Dβ – Jβ și Dβ – Jβ. Tipul predominant de recombinare pentru producerea unor gene funcționale RCT pare să corespundă legării V – D – J – C (fig. 112).

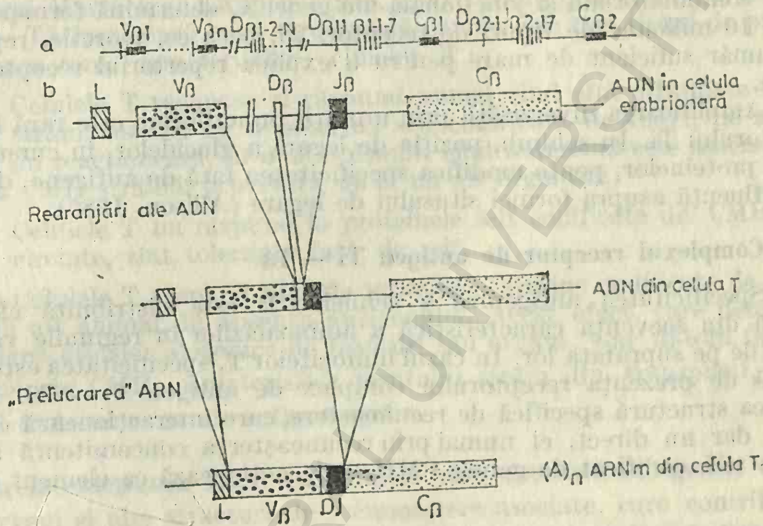


Fig. 112. – Reprezentare schematică a etapelor de rearanjare genetică și „prelucrare" a ARN, premergătoare exprimării ARNm pentru catena β a receptorului de antigen al limfocitelor T. Pentru simplificare, cei trei introni ai genei Cβ nu au fost reprezentați.

Analiza structurii genelor sugerează existența a patru mecanisme esențiale de producere a diversității receptorului Ti (John și Owen, 1985; Fitch, 1986):

1) Multiplicitatea regiunilor V, D și J, deși, în prezent, contribuția relativă a fiecărei regiuni este greu de estimat. Numărul genelor Vβ pare să fie mai mic decît cel al genelor V ale Ig, dar cel al regiunilor J este mult mai mare și cu un rol important în diversitatea catenelor β. Davis și Hood (1984) consideră că existența a două gene C identice ar fi determinată de existența unui număr mare de segmente ale regiunii J.

2) Asocierile combinatoriale ale segmentelor V, D și J par să fie mai mari decît în celulele B. Diversitatea potențială este mărită prin

* În limfocitele B, rearanjarea genelor pentru Ig se realizează prin mecanismul "12–23", care asigură recombinarea numai între o secvență-semnal de recombinare conservată (heptamer–nonamer), separată de un spațiator de 12 nucleotide, și una cu un spațiator de 23 de nucleotide.

faptul că aşezarea segmentelor de recunoaştere face formal posibile rearanjări de tipul D — D şi directe V — J.

3) Diversitatea regiunilor N-terminale evidenţiată la situsul de recombinare al segmentelor D şi J este legată de prezenţa unor nucleotide suplimentare, inserate între D şi J, şi respectiv între V şi J.

4) Diversitatea joncţională, produsă de legarea imprecisă a segmentelor V, D şi J poate duce la adiţia sau la deleţia de nucleotide la extremităţile acestor segmente sau la producerea de noi codoni. Probabil că aceste legări imprecise generează frecvent gene nefuncţionale, ca „preţ plătit" de celulele T pentru utilizarea acestui mecanism de producere a diversităţii (John şi Owen, 1985).

În ansamblu, aceste mecanisme, cărora li se adaugă cele de diversitate combinatorială şi joncţională ale genei α, determină formarea a cel puţin 10 milioane de tipuri de receptori Ti, ceea ce, teoretic, reprezintă un număr suficient de mare pentru a explica repertoriul receptorilor T la om.

Amplificarea diversităţii prin mutaţii punctiforme este rară în cazul receptorului Ti. În schimb, poziţia de legare a glucidelor, în cursul glicozilării proteinelor, poate modifica specificitatea faţă de antigene, deoarece are influenţă asupra formei situsului de legare (Allison, 1985).

Complexul receptor de antigen Ti — T3

Specificitatea antigenică a celulelor B este distribuită clonal şi rezultă din secvenţa caracteristică a aminoacizilor în regiunile variabile ale Ig de pe suprafaţa lor. În cazul limfocitelor T, specificitatea este determinată de prezenţa receptorului complex de antigen Ti — T3. El serveşte ca structură specifică de recunoaştere, care interacţionează cu antigenul, dar nu direct, ci numai prin recunoaşterea concomitentă a unui produs self, codificat de genele CMH, care acţionează ca element de restricţie.

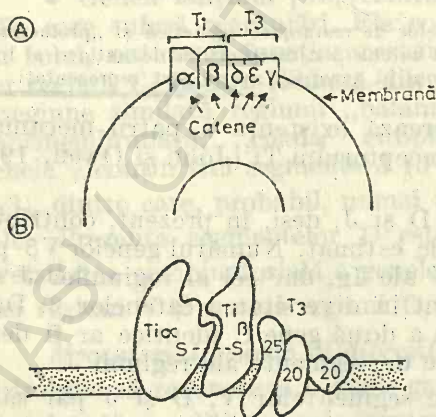


Fig. 113. — Receptorul complex de antigen T idiotip (Ti) — T3. A. Reprezentare schematică a catenelor componente, B. Relaţiile dintre subunităţile structurale: catenele Tiα şi Tiβ, ancorate în membrana citoplasmatică prin domeniile lor transmembranare şi unite printr-o punte disulfidică, sînt asociate cu subunitatea mare de 25 kdal a complexului T3 (după Reinherz, 1986).

La om, receptorul Ti — T3 este alcătuit din structura clonotipică a receptorului Ti (heterodimerul α şi β), asociată cu cele trei molecule monomorfe, invariabile, legate necovalent, ale complexului T3 (fig. 113).

În acest sens au fost furnizate o serie de argumente: 1) îndepărtarea lor are loc concomitent: imunoprecipitatele membranare produse cu ser anti-T3, solubilizate, conțin și heterodimerul Ti, legat necovalent; 2) numărul moleculelor de T3 și Ti pe suprafața unei celule este comparabil (~40 000 unități de legare/celulă) etc.

Modul de funcționare al complexului Ti — T3 nu este complet cunoscut. În general se admite că receptorul Ti determină specificitatea față de antigen, iar complexul C3 ar asigura transducția semnalului în interiorul celulei, amorsînd lanțul de evenimente care duc la activarea și proliferarea celulelor T.

După Marrack și Kappler (1986, 1987), receptorul complex de antigen Ti — T3 furnizează baza structurală pentru cele trei tipuri de procese de recunoaștere, caracteristice celulelor T:

1) Celulele T recunosc și răspund numai cînd sînt stimulate de un antigen străin, asociat cu o proteină self codificată de CMH, de același tip. Ele nu reacționează, în mod obișnuit, cînd antigenul este asociat cu o proteină CMH străină, provenită de la un alt organism.

2) Celulele T nu răspund la proteinele self codificate de CMH sau, cu alte cuvinte, sînt tolerante față de self.

3) Celulele T răspund față de proteinele străine codificate de CMH, de la un alt animal, în absența antigenului. Acest efect, care determină respingerea grefelor alogenice de țesuturi sau organe, s-ar datora faptului că proteinele CMH, caracteristice țesutului străin din transplant, apar, la nivel molecular, ca un antigen străin.

În interacțiunea RCT cu celulele care prezintă antigenele (CPA) ar interveni și alte structuri de recunoaștere asociate, care contribuie la aviditatea globală dintre limfocitele T și celulele CPA. Două dintre cele mai importante sînt chiar structurile denumite T4 și T8 (respectiv CD4 și CD8).

Receptorii γδ. Recent, Bank și colab. (1987), precum și Bluestone și colab. (1987) au semnalat prezența unui set suplimentar de molecule variabile, numite γδ, pe suprafața unui procent redus de celule T periferice și pe timocite. Ca și peptidele α din structura receptorilor T, proteinele γδ sînt codificate în urma unor rearanjări de gene. De asemenea, ca și receptorii αβ, sînt exprimate pe celulele T în asociere cu moleculele CD3. După unele date, anumite mecanisme, încă neelucidate, împiedică exprimarea simultană a proteinelor αβ și γδ pe aceeași celulă.

Semnificația receptorilor γδ nu este cunoscută, deoarece nu a fost stabilită natura liganzilor lor naturali (antigenele native, ca în cazul Ig sau antigenul străin + CMH, ca în cazul receptorilor T). După Marrack și Kappler (1987), complexele αβ și γδ cu moleculele CD3 ar putea activa funcțiile celulelor T și proliferarea acestora prin mecanisme similare.

Inducția toleranței față de substanțele self. „Educația" limfocitelor în timus

Faptul că, în mod normal, limfocitele nu reacționează cu antigenele proprii organismului în care se găsesc este una dintre cele mai importante și mai misterioase caracteristici ale sistemului imunitar. Întrucît toate organismele conțin aceleași sisteme embrionare de gene pentru imunoglobuline și pentru receptorii T și, ca urmare, au același potențial de răspuns imun, este evident că toleranța față de self trebuie dobîndită.

În concepția clasică se consideră că organismele tolerează substanțele self, deoarece clonele de celule T ce poartă receptori specifici pentru determinanții self sînt fie inactivate ireversibil („Clonal amnesia theory"), fie oprite în evoluție și eliminate („Clonal abortion theory"). Chiar autorii care nu admit aceste explicații consideră că populațiile de celule T reactive la self ar muri în cursul stadiilor lor timpurii de dezvoltare, datorită intervenției unui mecanism necunoscut. Ele sînt permanent „bombardate" în aceste faze cu molecule self și dispar, fiind clone „interzise" („Forbbiden clones").

„Educația" limfocitelor în timus

„Timusul este păzitorul individualității organismelor și marele educator al limfocitelor, pe care le „învață" să deosebească substanțele proprii (self) de cele străine (nonself). El îndeplinește această funcție, prin intermediul moleculelor complexului major de histocompatibilitate, care funcționează ca markeri de self.

J. Klein

Klein (1979) a sugerat că timusul nu este numai organul în care au loc diferențierea și specializarea limfocitelor T, ci și o „școală" pentru limfocite, unde acestea „învață" să recunoască substanțele self, dobîndind o proprietate esențială pentru participarea lor în răspunsul imun. Zinkernagel și Doherty (1979) au confirmat existența acestui fenomen, demonstrînd, printr-o serie de experiențe, că limfocitele T devin mature și funcționale numai după ce au stat o perioadă în timus, unde „învață" să recunoască antigenele străine numai în asociere cu antigenele lor proprii, reprezentate de proteinele codificate de genele CMH. Astfel, ei au demonstrat că iradierea șoarecilor, cu doze relativ mari de raze X sau γ (800—1 000 rad), omoară limfocitele și celule-stem din care provin, lăsînd viabile celulele somatice, inclusiv pe cele epiteliale din timus. Lipsite de sistem imunitar, animalele iradiate fac infecții frecvente și mor. Ele pot fi salvate prin transplant de măduvă de la un șoarece-martor normal, din aceeași linie genetică. În cazul în care măduva provine de la un șoarece donator aparținînd altei linii celulare, animalul receptor iradiat devine un „animal himeră", deoarece poartă două tipuri de celule: celulele somatice, inclusiv epiteliul timic, aparțin tipului propriu (H—2 CMH) organismului receptor, iar limfocitele transplantate, care colonizează măduva și organele limfoide, aparțin tipului organismului donator.

După refacerea sistemului imunitar însă, moleculele H—2 (codificate de CMH) de pe suprafaţa limfocitelor T sînt identice cu cele ale organismului receptor, ceea ce demonstrează rolul esenţial al acestuia în maturarea celulelor T.

Într-o altă serie de experienţe (fig. 114), menite să demonstreze rolul direct al timusului asupra celulelor T, Zinkernagel (1979) a utilizat şoarecii hibrizi AB, obţinuţi prin încrucişarea liniilor pure A şi B. Ei poartă în tot organismul două tipuri de antigene CMH, corespunzînd liniilor A şi B. Şoarecele hibrid injectat cu virusul choriomeningitei limfocitare (VCML) produce celule T_C. Izolate şi testate *in vitro*, ele omoară celulele infectate cu VCML, provenite atît de la şoarecii de tip A, cît şi de la cei de tip B. Deci, şoarecele hibrid AB produce celule T_C mature, cu caracter hibrid, care reacţionează specific cu antigenul străin viral, atît în prezenţa proteinelor CMH de tip A, cît şi a celor de tip B.

Pentru a evidenţia rolul direct al timusului, Zinkernagel a îndepărtat timusul unui şoarece hibrid şi l-a iradiat (800—1 000 rad) pentru a-i distruge celulele-stem şi limfocitele T şi B. După aceea, i-a transplantat celulele-stem hibride provenite de la un animal hibrid AB sănătos şi timusul iradiat de la un animal din linia B, în care limfocitele erau distruse, însă epiteliul timic păstrat funcţional. Şoarecele astfel „construit experimental" („hibrid" cu celule-stem hibride şi timus de tip B iradiat) este lăsat o perioadă de timp, după care este infectat cu VCML. Celulele T citotoxice hibride, provenite de la el, au fost testate *in vitro* faţă de celulele de tip A şi de tip B, infectate cu acelaşi virus. Ele sînt lipsite de acţiune faţă de celulele de tip A, dar omoară celulele injectate cu VCML de tip B. Studiul proteinelor codificate de CMH la animalele hibride a arătat că ele poartă pe toate celulele corpului ambele tipuri de antigene CMH (A şi B, corespunzătoare liniilor genetice ale animalelor studiate), cu excepţia celulelor nelimfoide din timus, care poartă numai proteine CMH de tip B.

Ideea unei intervenţii a timusului în „educaţia" limfocitelor este susţinută şi de unele observaţii microelectronografice, care sugerează legarea celulelor T imature de epiteliul timic (fig. 115). Ea s-ar putea realiza prin interacţiunea unor receptori de pe timocit cu proteinele care definesc caracterul de propriu (self) pe celulele epiteliale, ce stimulează maturarea sau „educaţia" timică. S-a emis chiar ipoteza că epiteliile cortexului timic ar avea un caracter „lipicios", care ar favoriza adeziunea timocitelor şi interacţiunea lor cu proteinele ce definesc caracterul de propriu pe celulele epiteliale, stimulînd maturarea şi „educaţia" timică.

În prezent, cei mai mulţi cercetători consideră că limfocitele T trec printr-un stadiu de maturare, în cursul căruia contactul cu antigenele self, la care sînt expuse constant, este urmat de un efect letal, ce înlătură celulele self-reactive. Celulele destinate să recunoască antigenele străine nu sînt eliminate în această fază deoarece ele nu întîlnesc deloc aceste antigene sau le întîlnesc doar accidental. Ca urmare, ele depăşesc stadiul tranzitoriu în care inducţia stării de toleranţă faţă de self este posibilă, devin mature şi trec în circulaţia în aşteptarea introducerii antigenului străin.

O altă ipoteză, citată de Marrack şi Kappler (1987), explică apariţia toleranţei prin interacţiunile unor populaţii de celule T_S şi T_H.

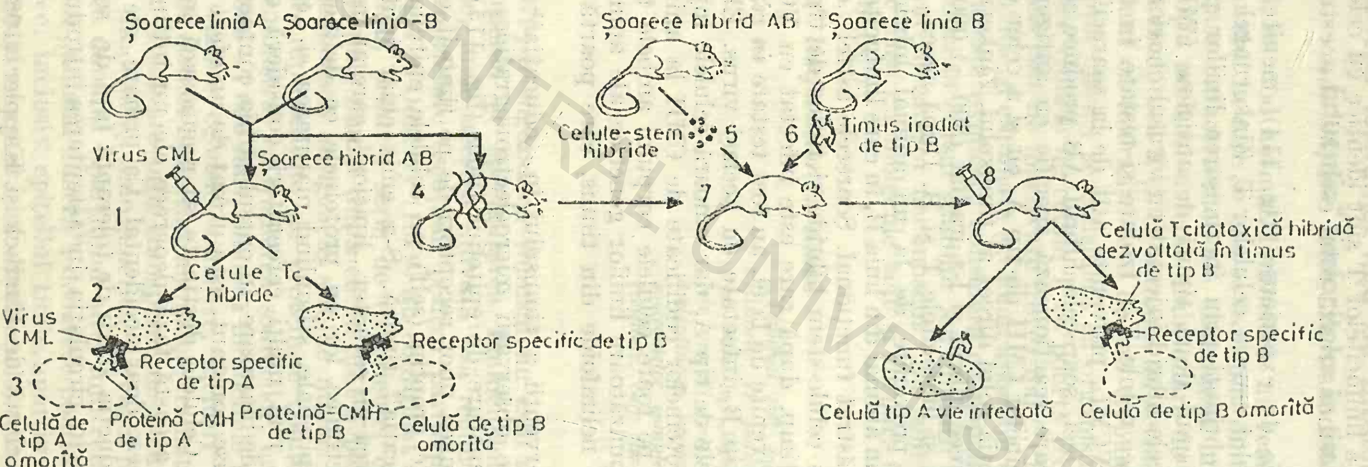


Fig. 114. — Reprezentare schematică a experienței lui Zinkernagel privind rolul timusului asupra celulelor T (după Marrack și Kappler, 1986).

Organismul nu poate iniţia un răspuns imun faţă de self datorită intervenţiei unei subpopulaţii specifice de celule T_S. Răspunsul faţă de antigenele străine este însă posibil datorită absenţei celulelor T_S corespunzătoare.

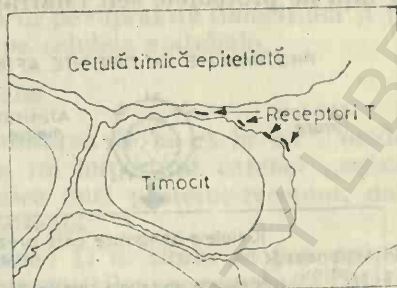


Fig. 115. — Reprezentare schematică după o microelectronografie, evidenţiind relaţia fizică strînsă dintre timocite şi celulele epiteliale din timus. Imaginea sugerează modul în care celulele T dobîndesc capacitatea de a recunoaşte celulele self, eveniment critic în specificitatea răspunsului imun (după Marrack şi Kappler, 1986).

Lo, Ron şi Spren (1986) admit, de asemenea, că limfocitele T reactive la self mor în timus într-o anumită fază a ciclului lor de diferenţiere şi maturare. Ei consideră însă că această fază ar corespunde stadiului în care timocitele interacţionează cu receptorii self prezenţi pe o serie de celule provenite originar din măduva oaselor. Ele ar fi reprezentate, în principal, de macrofagele timice, de celulele dendritice şi chiar de alte timocite.

Kappler şi colab. (1987), precum şi Kappler, Roehm şi Marrack (1987), pe baza unor studii pe şoarece, se raliază acestui punct de vedere. Rezultatele lor sugerează că toleranţa la self apare în cursul interacţiunii timocitelor în curs de dezvoltare cu celulele derivate din măduva oaselor într-o anumită perioadă anterioară diferenţierii lor la celule mature. Aceste date confirmă punctul de vedere exprimat de Kruisbeck şi colab. (1983). Încercînd să stabilească natura celulelor din stroma timică implicate în educaţia celulelor T, ei au sugerat că dobîndirea „preferinţei" pentru antigenele de clasa I poate fi disociată de cea pentru antigenele de clasa II, fapt care pledează pentru intervenţia unor celule timice diferite în acest proces.

Mecanismul prin care sînt eliminate celulele reactive la self rămîne însă misterios: unii cercetători consideră că ar fi degradate de macrofagele timice, în timp ce alţii consideră că într-un anumit stadiu de dezvoltare activarea timocitelor (respectiv amorsarea receptorilor lor prin legare de produşii CMH) ar fi un eveniment letal. Unele ipoteze au scos în evidenţă rolul potenţial al afinităţii timocitelor faţă de compuşii self în inducţia toleranţei. Ele pornesc de la premisa că mecanismele de selecţie recunosc celule care poartă receptori cu un spectru foarte larg de afinităţi faţă de produşii CMH, de la o afinitate foarte mică pînă la o afinitate foarte mare. Pentru a iniţia procesul de diferenţiere, timocitele imature trebuie să fie capabile să recunoască antigenele self CMH proprii din timus, în absenţa oricărui antigen străin însoţitor. Deci trebuie să aibă o afinitate foarte mare faţă de aceştia. Ulterior, procesul de toleranţă îndepărtează celulele cu afinităţi cuprinse între moderate şi foarte mari. În aceste condiţii se vor matura la stadiul de celule T imunocompetente pentru a trece în circulaţia generală numai timocitele cu afinitate mică pentru CMH, lipsite de agresivitate faţă de constituenţii proprii (fig. 116).

Pentru a fi activate la celule T efectoare, ele trebuie să recunoască şi să se lege de compuşii CMH numai în asociere cu antigenul străin. În acest proces, antigenul străin-nonself ar amplifica prin prezenţa sa afinitatea faţă de proteinele self (Marrack şi Kappler, 1987).

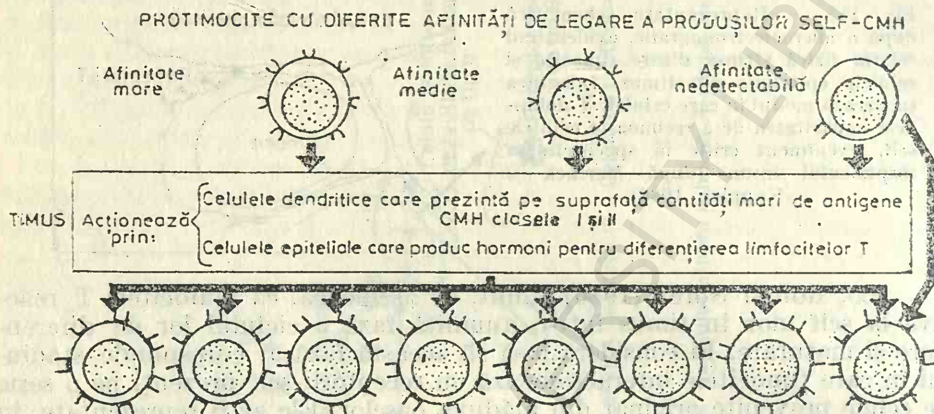


Fig. 116. — Rolul timusului în „educaţia" limfocitelor T. Reprezentare schematică a ipotezei referitoare la selecţia în timus a celulelor care au afinitate mică faţă de compuşii self-CMH (modificat după Wigzell, 1985).

Apariţia şi prezenţa antigenelor CMH în timus

La şoarece, în ontogeneză, celulele epiteliale care exprimă antigene CMH de clasele I şi II sînt detectate începînd din ziua a 14-a de gestaţie, în timp ce celulele mezenchimale care exprimă numai antigene de clasa II apar a 15-a zi (Jenkinson, 1981). În embriogeneză, nu se observă tendinţa de compartimentare descrisă la adult, la care cele două tipuri de celule au o localizare microambientală diferită: celulele care poartă antigene de clasa I predomină în stroma medulară, în timp ce cele care exprimă antigene de clasele I şi II sînt prezente atît în cortex, cît şi în regiunea medulară. Există însă şi zone mari, corticomedulare CMH negative. Pentru a explica mecanismul molecular al „educaţiei" limfocitelor în timus au fost propuse două modele:

Modelul de învăţare prin selecţie

Are la bază presupunerea că limfocitele T ar avea un anumit repertoriu de receptori, pentru o gamă variată de antigene străine, şi o serie de receptori pentru o gamă de antigene CMH (Klein, 1980). Epiteliul timusului ar acţiona pentru a selecţiona numai acele celule care poartă receptori pentru moleculele CMH autohtone, prezente pe suprafaţa epiteliului timic. În acelaşi timp, acest proces de selecţie ar limita şi gama receptorilor de antigene străine la cele prezente pe celulele reţinute prin acest mecanism.

Mecanismul selecţiei receptorilor pentru moleculele de clasa I CMH (H—2 la şoarece) ar fi la originea dublei specificităţi a celulelor T_C, care omoară celulele infectate cu virusuri. Un mecanism identic ar prezida

selecţia celulelor T_{II} care „învaţă" în timus să recunoască antigenele de clasa II CMH autohtone. Modelul se sprijină pe aspecte microelectronografice, care sugerează o interacţiune directă între anumite situsuri de legare, respectiv moleculele de receptori de pe suprafaţa timocitului şi proteinele care definesc caracterul „self" pe celulele epiteliale.

Modelul Susumi Tonegawa — Raulet

Cunoscut sub denumirea de „comutarea de la γβ la αβ", modelul Tonegawa — Raulet (1985) atribuie un rol important catenei „orfane", care are toate proprietăţile caracteristice unei proteine-receptor, dar a cărei funcţie în celulele T este necunoscută.

Modelul are la bază cîteva premise : 1) în timus se pot propaga, dezvolta şi diferenţia numai celule compatibile cu proteinele CMH ale acestui organ ; 2) condiţia funcţionării sistemului este ca limfocitele T imature să recunoască antigenele CMH şi să reacţioneze cu ele în absenţa unui antigen nonself ; 3) această proprietate este pierdută cînd celulele T sînt eliberate din timus, deoarece altfel ele ar ataca celulele proprii organismului.

Modelul propune următoarele modificări biochimice pentru a explica acest comportament (fig. 117). În celulele T imature, genele γ şi β sînt funcţionale şi codifică producerea unor cantităţi importante de proteine. Gena α este exprimată la nivel foarte scăzut. Celulele T imature au recep-

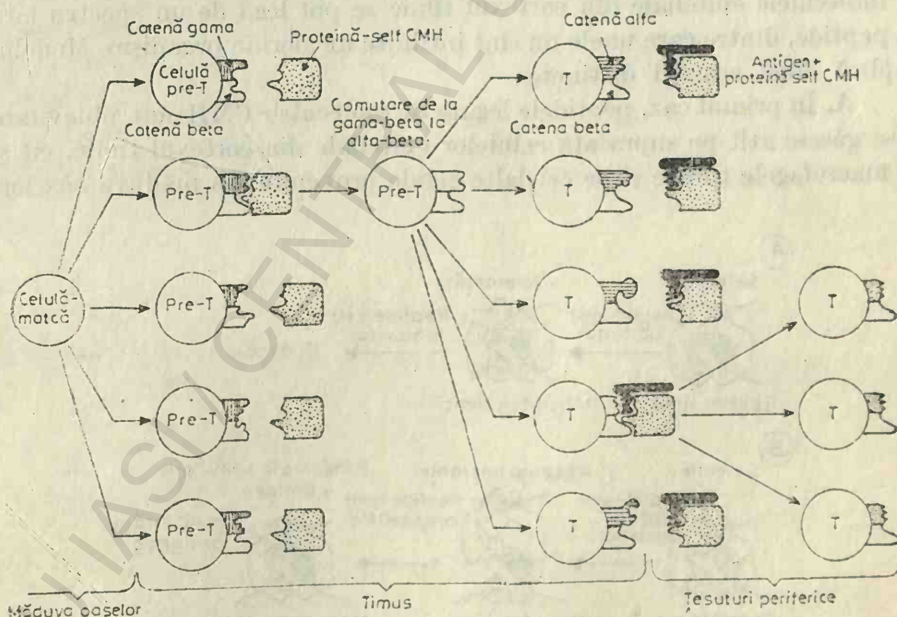


Fig. 117. — „Educaţia" timică a celulelor T. Reprezentare schematică a dezvoltării funcţionale a celulelor T, după modelul Tonegawa—Raulet (după Tonegawa, 1985).

tori compuși dintr-o catenă γ și una β, și reacționează fără nici o altă condiție cu proteinele CMH. În cursul diferențierii, gena γ devine inactivă, în timp ce gena α este activată, astfel că celulele mature au receptori $\alpha - \beta$. Această modificare reduce afinitatea receptorului pentru proteinele sistemului CMH, fără a o anula complet, datorită prezenței catenei β.

Mecanismul ar funcționa într-un mod analog celui descris în cursul tranziției de la forma fetală la cea adultă a hemoglobinei în hematii. Celulele T modificate prin „educție" în timus „recunosc" proteinele self CMH numai în asociere cu antigenele străine.

Modelul „peptidului" pentru selecția limfocitelor în timus. Recent, Marrack și Kappler (1987), analizînd principalele ipoteze referitoare la inducția toleranței la self, ajung la concluzia că „din nefericire, din numărul mare de teorii propuse, nici una nu este convingătoare". Mai multe date experimentale recente pledează pentru ideea că toleranța nu pare să fie indusă ca răspuns la moleculele CMH de pe epiteliul timic. De asemenea, argumentul selecției pe baza afinității receptorilor timocitelor pentru moleculele CMH nu este riguros exact. Dificultatea majoră rezidă într-o comportare paradoxală a celulelor T: cînd părăsesc timusul, ele sînt tolerante față de moleculele CMH-self, dar poartă receptori capabili să recunoască antigenele străine numai în asociere cu produșii CMH, exprimați pe celulele din timus.

Marrack și Kappler propun un nou model bazat pe presupunerea că moleculele epiteliale din cortexul timic se pot lega de un spectru larg de peptide, dintre care unele nu sînt întîlnite nicăieri în organism. Modelul implică două situații distincte:

A. În primul caz, peptidele legate de moleculele CMH sînt ubicvitare și se găsesc atît pe suprafața celulelor epiteliale din cortexul timic, cît și pe macrofagele timice și pe celelalte celule provenite din măduva oaselor.

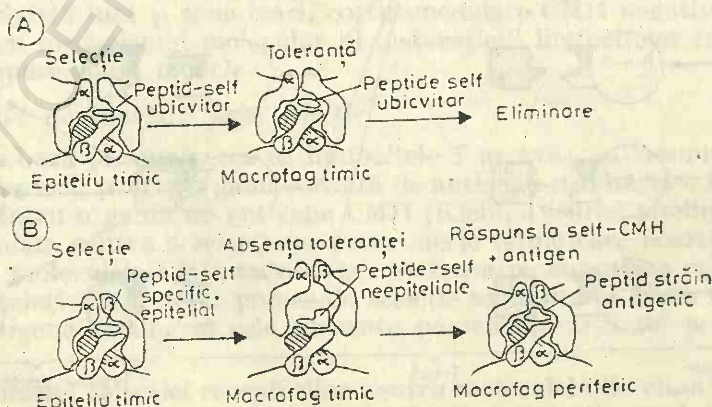


Fig. 118. — Modelul „peptidului" pentru selecția limfocitelor în timus (după Marrack și Kappler, 1987).

Timocitele care poartă receptori ce pot interacționa cu această combinație de peptide self ubicvitare și cu molecule CMH vor fi selecționate, făcute tolerante și eliminate (fig. 118A).

B. În al doilea caz posibil, peptidele self sînt riguros specifice. Ele sînt prezente exclusiv pe celulele epiteliale ale corticalei timusului. Timocitele care poartă receptori capabili să lege moleculele CMH în asociere cu aceste peptide specifice vor fi selecționate, dar nu vor fi făcute tolerante (fig. 118B). Ele se vor matura și vor trece în circulația generală pentru a forma populația de celule T periferice. Acestea sînt capabile să recunoască antigenele străine și vor fi activate de peptidele antigenice ce mimează structura peptidelor de pe suprafața epiteliilor corticale timice, care au determinat selecția lor.

Limfocitele B

Celulele B reprezintă cea de-a doua clasă majoră de limfocite. Importanța lor derivă din faptul că, împreună cu descendenții lor diferențiați, limfoblastele B și plasmocitele, sînt răspunzătoare de răspunsul imun mediat umoral, fiind singurele celule capabile să sintetizeze Ig-anticorp. Diversitatea enormă a acestora este asigurată de prezența, în fiecare organism, a mai multor milioane de clone de celule B, fiecare programată genetic să producă molecule de Ig avînd o specificitate unică de legare a antigenului.

Ontogeneza celulelor B

Ca și în cazul celulelor T, în linii mari, ontogeneza limfocitelor B are ca punct de plecare o celulă-stem pluripotentă și evoluează în două etape succesive (fig. 119):

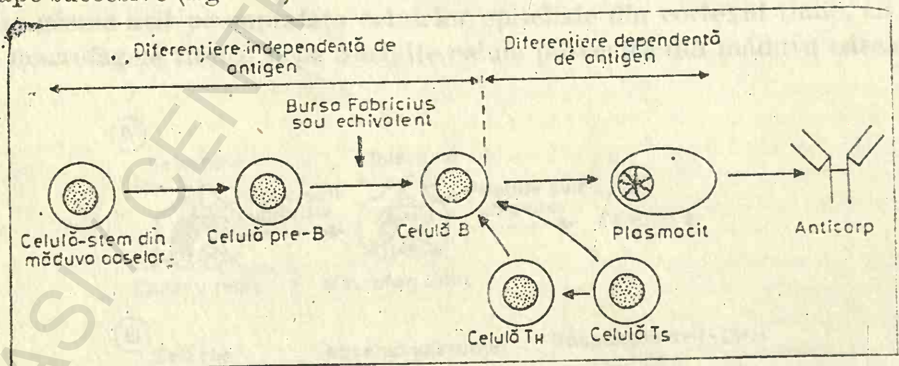


Fig. 119. — Maturarea limfocitelor B. Inducția diferențierii într-un mediu lipsit de antigen este urmată de diferențierea și maturarea periferică la plasmocite și celule B cu memorie, în prezența antigenelor (după Haenney, 1985).

1) **Etapa independentă de antigen** se desfășoară sub influența unor organe sau factori inductori primari (bursa lui Fabricius la păsări și echivalenții săi la mamifere). Ea implică stadiul de diferențiere pre-B, în care are loc reorganizarea genelor pentru Ig și, prin aceasta, asigurarea diversității răspunsului în anticorpi (*diversitatea clonală*). Produsul final al

acestei faze este celula B virgină imunocompetentă, care migrează în organele limfoide periferice.

2) **Etapa dependentă de antigen** implică, în primul rînd, evoluția celulelor virgine la stadiul de celule B mature și stimularea acestora prin contactul cu antigenele și, eventual, prin interacțiunea cu celulele T_H sau cu mitogeni policlonali nespecifici. Ea asigură selecționarea clonei (subpopulației) de celule B corespunzătoare antigenului, care suferă o activare, urmată de proliferare și diferențiere, pînă la stadiul final de plasmocit, celulă secretoare de anticorpi. Antigenele sînt reprezentate de diferite molecule din alimente, de microorganisme aparținînd microbiotei proprii sau invadante. Melchers (1980) consideră că bacteriile indigene din organismul mamiferelor reprezintă un set de antigene „quasi-self" cu rol efectiv în diferențierea celulelor B. Ca o consecință posibilă, cel puțin o parte din repertoriul de gene pentru regiunea V a Ig prezent în celulele liniei germinale poate fi „antibacteriană". Milon și Marchal (1985) citează datele lui Asherson și Zembala după care, zilnic, ~ 0,01% din conținutul intestinal, degradat corespunzător, poate ajunge în circulație, într-o formă capabilă să stimuleze sistemul imunitar. Or, dacă 1 g de materii fecale conține ~ $10^9 - 10^{11}$ bacterii, ~ 100 milioane de bacterii pot trece zilnic în circulația generală, cele mai multe viabile. Aceste bacterii comensale au un rol esențial în apărare deoarece sînt la originea unei stimulări antigenice permanente.

În cursul ontogenezei, celulele B suferă o serie de modificări morfologice, precum și modificări în capacitatea de a exprima diferite antigene și receptori de suprafață. Ele sînt strîns corelate cu anumite faze distincte ale procesului de diferențiere și cu unele particularități funcționale, care asigură o diversificare a capacității de a sintetiza și secreta o gamă imensă de anticorpi diferiți.

Studiul ontogenezei lor a fost efectuat în primul rînd la păsări, la care separarea evidentă în organe diferite (bursa lui Fabricius pentru celulele B și timusul pentru celulele T) a facilitat acest proces. Celulele B sînt prezente la toate vertebratele studiate, inclusiv la reptile, amfibieni, pești osoși și cartilaginoși. Derivarea lor din celula-stem pluripotentă este relativ puțin cunoscută, datorită numărului mic de markeri fenotipici utilizabili pentru identificare și caracterului dinamic al compartimentelor în care se găsesc. Ea a fost studiată și demonstrată la șoarece, cu ajutorul markerilor induși prin iradiere, și la om, cu ajutorul markerilor citogenetici și enzimatici, în cursul unor boli genetice asociate cu expansiunea limitată a celulelor-stem hematopoetice (Zola, 1985). Rovigatti (1984), precum și Vogler (1979, 1985) sugerează pentru celulele B o filiație mai apropiată de precursorii mieloizi decît de celulele T.

Diferențierea celulelor B la mamifere

Ca și în cazul păsărilor, sursa de celule-stem este tot sacul vitelin, de la care acestea circulă în ficatul fetal și splină, înainte de a se localiza în măduvă. La mamifere, diferențierea precursorilor B este probabil multifocală, deoarece are mai multe situsuri potențiale în organism. Defi-

nirea acestor situsuri, semnificația lor relativă și evoluția diferențierii și maturării celulelor B la nivelul lor sînt mai greu de studiat din două motive : 1) sînt organe vitale, care nu pot fi îndepărtate chirurgical sau blocate funcțional ; 2) celulele B sînt cu mult depășite numeric de celulele eritroide și mieloide imature.

Rolul primordial al ficatului este demonstrat de două experimente :

1) transplantul de ficat fetal, recoltat la 12 — 14 zile de gestație la șoarece (respectiv 6 săptămîni la om), restabilește funcțiile deficitare ale celulelor B la animalele receptoare cu deficit B (Bortin și Rimm, 1977);

2) culturile de țesut hepatic, recoltat în zilele 12 — 15 de gestație, produc în culturi de celule, după 5 — 6 zile, celule B, care pot fi evidențiate cu ajutorul anticorpilor marcați, specifici pentru catenele grele (H) ale Ig (Cooper, Owen și Raff, 1974). La șoarece, începînd din zilele 16 — 17, această funcție poate fi preluată și de splină (fig. 120) (nu se știe dacă nu intervine o influență determinată de trecerea inițială prin ficat). La animalele adulte, ca și la om, acest rol este preluat integral pentru tot restul vieții de măduva oaselor.

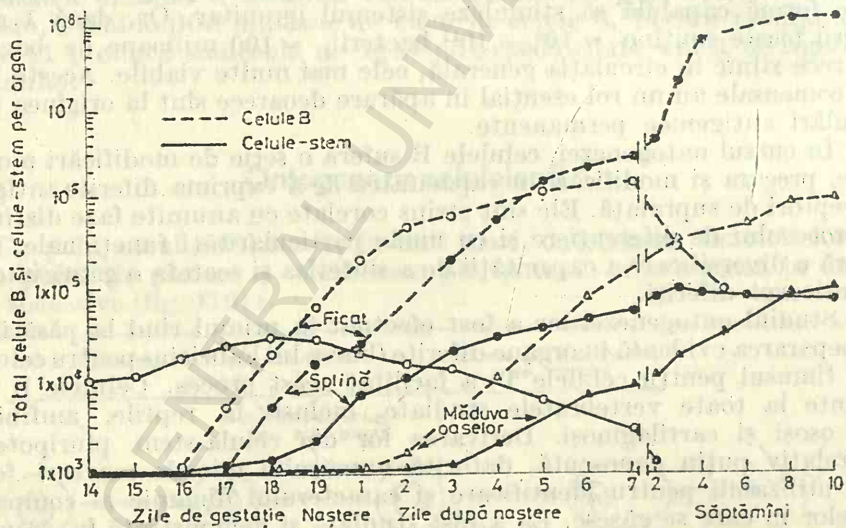


Fig. 120. — Emergența limfocitelor B și a celulelor-stem în țesuturile hematopoetice fetale și ale șoarecelui nou-născut. Graficul evidențiază faptul că ficatul funcționează nu numai ca o sursă de celule-stem pentru diferențierea limfocitelor B, ci și ca un organ de localizare timpurie și constantă pentru limfocitele B (după Kincade și Moore, 1977).

Au mai fost sugerate ca sedii potențiale de diferențiere a celulelor B, centrii germinativi, țesuturile limfoide intestinale (apendice, plăci Peyer), amigdale etc, dar, după Greaves, Owen și Raff (1974) sînt prea puține probe pentru a le atribui un rol-cheie.

Celulele pre-B. Celulele precursoare B sînt prezente în ficatul fetal la șoarece după 12 — 14 zile de gestație (după Vogler și Lawton (1985) chiar după 8 zile), iar în splină și măduvă, după două săptămîni de la naștere. La om, ele apar în ficat după 7 — 8 săptămîni de gestație.

Sînt lipsite de receptori de antigen (Ig) pe suprafaţa celulară, dar exprimă o serie de antigene caracteristice, asociate cu linia de dezvoltare, B, ca : receptori pentru virusul Epstein-Barr (VEB), receptori pentru eritrocitele de şoarece şi o mare cantitate din enzima nucleară *dinucleotidil terminal transferaza*. În prezent, nu se ştie dacă ele derivă direct, prin diviziune şi maturare din celulele-stem, sau din diviziunea unor celule apărute mai tardiv. După Zola (1985), unul din produsele directe ale celulelor-stem ar fi *progenitorul limfoid*, ancestor comun al celulelor B şi T.

Studiile asupra unor precursori uniformi ai celulelor pre-B leucemice au evidenţiat un stadiu foarte timpuriu al acestora, reprezentat de celule care nu conţin nici o catenă imunoglobulinică, dar care au genele Ig „rearanjate". Acest tip de celule pot fi considerate progenitori „angajaţi" ai liniei B. Ele sînt *celule pre-B mari*, imature, care proliferează rapid, aşa încît după 45 minute de expunere la $[^3H]$ timidină, 90% din ele sînt marcate. În 24 de ore, întreaga populaţie este reînnoită. Rearanjarea implică iniţial joncţiunea segmentelor D — J, apoi V — D şi ulterior transcrierea complexului V — D — J asociat cu genele regiunii $C\mu$. Ea determină apariţia catenei μ în citoplasma (μcit) unor celule pre-B mari de tip limfoblast cu fenotipul $\mu cit^+L^-Igm^-$, care sintetizează activ ADN şi se divid rapid. Deşi rearanjarea genelor poate apărea pe ambii cromosomi, rearanjările productive au loc numai pe un singur cromosom, împiedicînd astfel producerea de catene cu specificităţi diferite într-o singură celulă B.

Ritmul rapid de diviziune al acestor celule permite, pe de o parte, exprimarea întregului potenţial de specificităţi care pot fi generate prin recombinarea segmentelor de gene Ig (*diversitatea clonală*) şi, pe de alta, compensează marea frecvenţă a clonelor abortive, care rezultă din rearanjările neproductive ale genelor. Prezenţa terminal transferazei în celulele pre-B poate contribui suplimentar la diversitatea joncţională, prin adăugarea de scurte secvenţe nucleotidice, la nivelul situsurilor de joncţiune V_H, D_H şi J_H (Desiderio şi colab., 1984). În această fază, genele pentru catenele L se menţin cu structura nativă, caracteristică liniei germinale. În urma acestor diviziuni, celulele pre-B mari de tip limfoblast, cu catene μ în citoplasmă (μ cit^+) produc *celule pre-B mici* cu potenţial scăzut de proliferare.

După 11 — 16 săptămîni de gestaţie, celulele pre-B mari şi mici depăşesc numeric celulele progene în ficatul fetal uman, iar celulele pre-B mici încep să colonizeze splina. Celulele pre-B sînt produse în grămezi laxe, diseminate printre celulele eritroide şi mieloide, mai abundente, în special în zonele extrasinusoidale, în apropierea celulelor hepatice parenchimatoase.

După ce limfopoeza embrionară trece în măduva oaselor (diminuînd progresiv pînă la dispariţie în ficat), ea continuă cu mici diferenţe, alături de celelalte linii celulare sanguine, pentru tot restul vieţii. La mamiferele mature imunologic, stadiul de celule pre-B este limitat la măduva oaselor. Durata tranzitului, în compartimentul pre-B, este de ~ 5 zile în ficatul de şoarece şi de ~ 4 zile în măduvă (Vogler şi Lawton, 1985).

Celulele B. Rearanjarea genelor pentru catena L a Ig în celulele pre-B mici progene (corespunzînd stadiului lor tardiv de evoluţie) este urmată de diminuarea sintezei de ADN şi de exprimarea Ig pe suprafaţa

membranei celulare (Igm). Conceptual deci, particularitatea fundamentală a celulelor B este exprimarea imunoglobulinelor membranare și, odată cu aceasta, posibilitatea diferențierii ulterioare dependentă de antigen, în urma selecției clonale a subpopulației corespunzătoare. Procesul evoluează în două faze succesive :

1) *Celulele B imature* au fenotipul Igm M^+/D^- și sînt detectabile în ficatul fetal la șoarece, începînd din zilele 15 — 17, pînă la cîteva zile după naștere. La om, conversia celulelor pre-B în B imature are loc ~ în a 10-a săptămînă de gestație și continuă pînă la naștere (Vogler și Lawton, 1985). Celulele B imature poartă pe suprafață un singur tip de Ig, aparținînd clasei IgM, care au structura caracteristică necesară pentru „ancorarea" ca proteină integrată în stratul dublu fosfolipidic membranar (fig. 121).

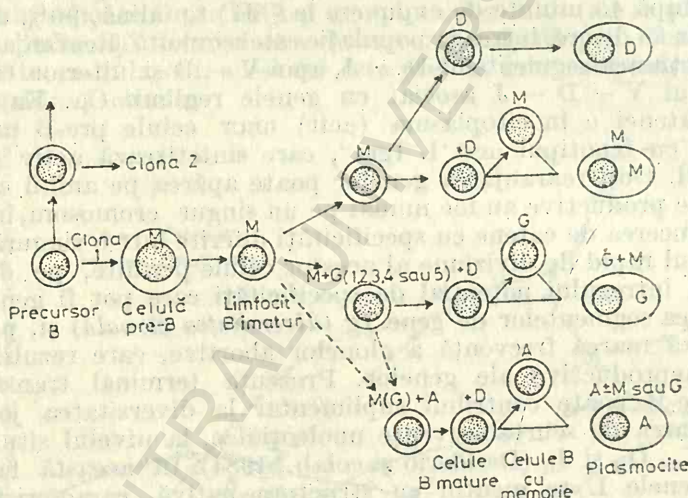


Fig. 121. — Reprezentare schematică a diferitelor stadii în diferențierea unei clone de celule B, ilustrînd concepția actuală privind producerea intraclonală a diversității de clasă sau izotipice. Tipul de celulă-pivot în comutare este limfocitul imatur, cu IgM pe suprafață, care se poate matura pentru a exprima alte clase de Ig. Fiecare celulă din schemă reprezintă, în realitate, celule multiple. Spre exemplu, fiecare din subpopulațiile de celule care exprimă IgG produce numai una din cele patru subclase. Producerea de IgDm este exprimată tardiv pe toate subpopulațiile și, cu excepția celulelor B care produc IgD, este anulată după stimulare antigenică sau cu mitogeni (din Mota, 1986).

Aceasta demonstrează că tranziția de la stadiul pre-B (cu catene μ în citoplasmă) la stadiul B imatur cu IgM „ancorat" în membrană implică nu numai exprimarea genelor L, ci și modificarea mecanismului de prelucrare a ARNμ precursori, pentru a forma o catenă μ cu o secvență suplimentară, hidrofobă de 26 de aminoacizi. În populația de celule Bμ (BIgM) este reprezentat integral întregul repertoriu de legare a antigenelor, însă cu un singur tip de specificitate pe o singură celulă, deoarece rearanjarea segmentelor de gene V_H și V_L se face în fiecare celulă aleatoriu.

Una din particularitățile fundamentale ale celulelor B imature este determinată de faptul că sînt expuse unui proces de selecție negativă : contactul lor cu antigenul corespunzător nu este urmat de proliferare și

diferențiere, ca în cazul celulelor mature, ci de inhibare clonală și inactivare. Fenomenul are la bază desprinderea sau „modularea" moleculelor de IgM de pe suprafața celu elor B imature, după expunerea lor la acțiunea antigenelor specifice sau a anticorpilor anti-Ig. În plus, spre deosebire de celulele B mature, celulele B imature sînt incapabile să resintetizeze și să exprime IgMm „modulate". Deoarece în perioadele timpurii ale dezvoltării fetale singurele antigene disponibile care ar putea produce acest fenomen sînt antigenele proprii, modularea prelungită determină toleranța imunitară față de self. Prin acest mecanism, de *anergie clonală* este împiedicată dezvoltarea unor clone autoreactive, care ar putea produce un răspuns imun prea puternic, și deci dăunător, la adult în circumstanțe asemănătoare. După Cooper și colab. (1984), fazele pre-B, ca și cele B timpurii corespund unei risipe considerabile de celule. Ele sînt compensate de amplificarea clonală prin diviziune celulară, care se poate produce în mai multe etape ale căilor de diferențiere, ceea ce face ca într-o clonă de celule B stimulate de un antigen celulele cel mai puțin diferențiate din serie să fie prezentate în numărul cel mai mic.

2) *Celulele B mature.* Pe măsură ce celulele B imature ($IgMm^{+}$) care nu au fost făcute nereactive se maturează, încep să exprime al doilea izotip de Ig membranare (IgD) și, odată cu aceasta, și alte glicoproteine membranare ca, de exemplu, receptorii de complement și Fc pentru IgG secretate. Diversitatea izotipică apare în fiecare clonă de celule B în curs de dezvoltare și se realizează în faza de tranziție de la celula B imatură la cea matură (fig. 122).

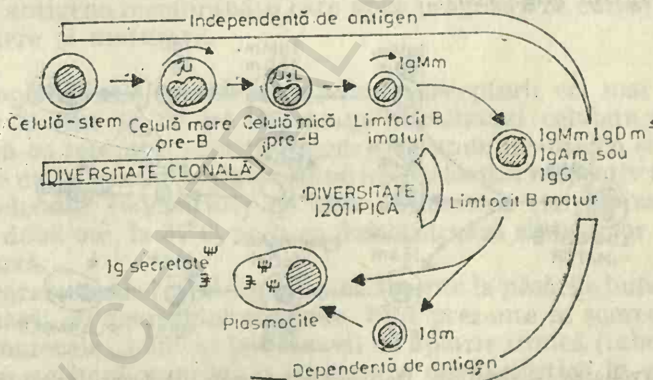


Fig. 122. — Diferențierea și dezvoltarea diversității intraclonale a limfocitelor B. Diversitatea clonală apare prin rearanjarea genelor V_HDJ_H și V_LJ_L, în cursul fazelor pre-B independente de antigen ale dezvoltării celulei B. Diversitatea izotipică apare în fiecare clonă de celule B. Comutarea izotipică este observată în medii protejate de antigen, dar poate fi influențată de antigen și de stimuli proveniți de la celulele T (după Lawton, 1982).

Tipul de celulă-pivot în comutarea sintezei de la un tip de Ig la alta este limfocitul imatur cu IgM pe suprafața sa, care prin maturare poate să exprime alte clase de Ig. Ca urmare, comutarea izotipică în cursul ontogeniei și posibilitatea exprimării unor clase adiționale de Ig se realizează prin translocația genelor V — D — J de la Cμ la alte gene CH_H diferite.

Ea are loc în medii lipsite de antigene, dar poate fi influenţată de antigen şi de stimulii celulelor T. În cursul acestor comutări, specificitatea pentru un anumit antigen rămîne nealterată, în cadrul fiecărei clone de celule B. În schimb, ele oferă posibilitatea producerii unor Ig cu funcţii biologice diferite (tabelul nr. 39).

Tabelul nr. 39

Etapele diferenţierii celulelor B şi caracteristicile Ig (după Zola, 1985)

Tipul de celule →	Celula-stem pluripotentă	Progenitorul angajat	Celula pre-B	LIMFOCITE B Imature	LIMFOCITE B Mature*	Plasmocitul
Caracteristicile Ig →	Genele Ig ca în linia germinală	Gene Ig rearanjate Igm⁻	Ig în citoplasmă⁺	Igm M⁺/D⁻	Igm M⁺/D⁺	Ig în citoplasmă şi secretată ++++

* Celulele B mature, virgine.

Celulele IgMm⁺/IgDm⁺ sînt funcţional imunocompetente virgine. Celulele triplu izotipice IgMm⁺, IgDm⁺ şi IgAm⁺ sau IgGm⁺ par să derive de la IgM⁺/IgD⁺ deşi, rar, au fost observate şi celule care poartă numai IgAm sau IgGm (fig. 123).

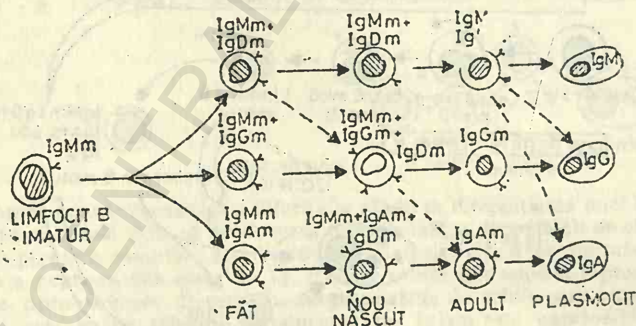


Fig. 123. — Dezvoltarea diversităţii izotipice intraclonale. Schema prezintă fenotipurile predominante ale limfocitelor B, în timpul diferitelor etape ale ontogeniei. Celulele B imature care poartă numai IgM pe suprafaţa membranei (μm) exprimă alte clase suplimentare de Ig de suprafaţă, ca rezultat al translocării genelor VDJ de la $C\mu$ la alte gene C_H diferite. Deoarece exprimarea catenelor L este nemodificată, fiecare clonă de celule B îşi menţine constantă specificitatea pentru antigen cînd dobîndeşte capacitatea de a secreta imunoglobuline cu alte funcţii biologice. Săgeţile continue marchează secvenţele de comutare predominante, bazate pe date ontogenetice. Săgeţile întrerupte prezintă căile alternative, observate *in vitro*, în cercetările referitoare la diversitatea izotipică a unor clone unice de celule B (după Lawton, 1982).

După Vogler şi Lawton (1985), apariţia celulelor B cu IgA de suprafaţă s-ar face sub influenţe microambientale la nivelul criptelor glandulare ale ţesutului limfoid rinofaringian. „Comutarea" sintezei reglată de celulele T_H s-ar face, în funcţie de natura mucoasei şi de mediul său

bacterian, pe trei căi: 1) $BIgM^+ \rightarrow BIgG^+ \rightarrow BIgA^+$; 2) $BIgM^+ \rightarrow BIgA^+$; 3) $BIgD^+ \rightarrow BIgA^+$ (fig. 123). Frecvența relativ mare a IgD pe membrana celulară sugerează un rol important al acestora corelat cu membrana.

Prezența Ig pe suprafața celulelor are un rol fundamental în evoluția procesului imun, deoarece permite celulelor B „să vadă" antigenele și să declanșeze proliferarea și diferențierea lor la plasmocite. Fig. 122 și 123 prezintă sintetic cinetica apariției diferitelor izotipuri de Ig, în raport cu diferențierea și maturarea celulelor B.

Limfocitele B mature imunocompetente formează o populație de celule sedentare, extrem de heterogenă sub raportul specificității pentru diferite antigene, care, după ce au ajuns în organele limfoide secundare, dacă nu sînt stimulate de antigene, trăiesc maximum 10 zile. Diversitatea enormă a acestor clone reflectă diversitatea la fel de mare a tipurilor de anticorpi care pot fi produși de organism în urma interacțiunii cu antigenele. Introducerea unui antigen în organism determină activarea selectivă și amplificarea specifică a acelui set de celule B, ce posedă receptori specifici pentru recunoașterea antigenului străin, asociate cu diferențierea la plasmocite care produc anticorpi specifici pentru determinantul antigenic stimulator.

Particularitățile fenotipice ale celulelor B

Limfocitele B mature exprimă pe suprafața lor un set complex de receptori și antigene membranare care apar progresiv în cursul procesului de diferențiere și maturare.

Imunoglobulinele suprafeței celulare. Receptorii cei mai cunoscuți ai celulelor B sînt Ig de pe suprafața membranei celulare (Igm). Ele funcționează ca receptori specifici pentru un anumit antigen și au aceeași specificitate cu Ig pe care le poate sintetiza limfocitul respectiv sau descendenții săi clonali. Îndepărtați pe cale enzimatică (tripsinizare), ele se refac după două ore, la 37°C, ceea ce demonstrează sinteza lor de celulele care le poartă.

Sînt caracteristice celulelor B: sînt absente la păsările bursectomizate sau la bolnavii cu agamaglobulinemie. Sînt prezente la șoarecii timectomizați, la șoarecele „nud" și la bolnavii cu aplazie timică (tabelul nr. 40). Apariția lor izotipică urmează o succesiune caracteristică în cursul ontogenezei (fig. 124).

Igm au o structură diferită de cele secretate, datorită prezenței unei secvențe hidrofobe transmembranare suplimentare care le ancorează în membrana celulară și unui scurt domeniu citoplasmatic. În felul acesta, receptorul Ig are toate proprietățile receptorilor de suprafață celulară, în general. El are ca prototip receptorul IgM, a cărui secvență de aminoacizi este cunoscută. Cea mai mare parte (domeniile variabile și patru domenii distincte ale regiunii constante ($C\mu1 - C\mu4$) sînt expuse extracelular, ceea ce permite detectarea prin imunofluorescență cu seruri anti-Ig marcate. De asemenea, plasmocitele, deși secretă Ig, sînt cel mai frecvent lipsite de Igm.

Moleculele de Igm acționează ca molecule de recunoaștere specifică pentru antigene. Detectarea lor se poate face cu antiseruri marcate radioactiv sau cu fluoresceină, iar pe microelectronografii cu ajutorul anticorpilor anti-Ig marcați cu feritină *. Experimental s-a demonstrat distribuția difuză a Ig pe suprafața celulelor B și redistribuirea lor pentru a forma

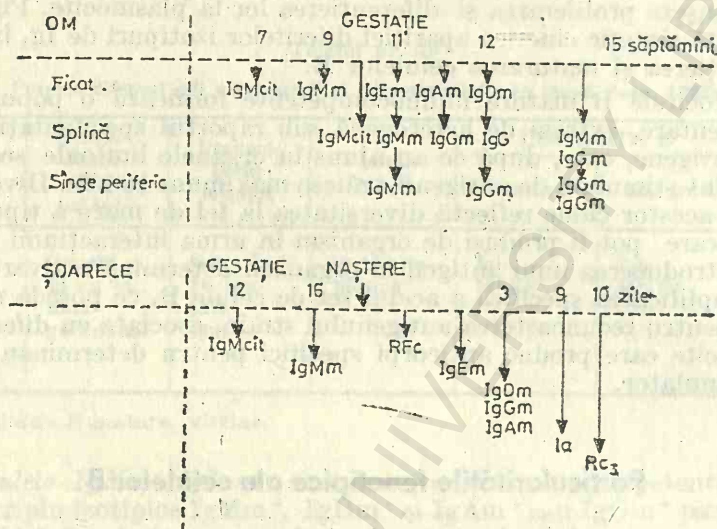


Fig. 124. — Schema apariției progresive a Ig, a receptorilor Fc (RFc) și a antigenelor Ia în ontogeneza limfocitelor B la om și la șoarece (după Astaldi și colab., 1980).

Tabelul nr. 40

Distribuția procentuală a IgM și IgD pe suprafața limfocitelor umane (după Viletta și Uhr, 1975)

	IgD	IgM
Măduva oaselor	0	100
Splina	57	43
Ganglionii limfatici	71	29
Canalul toracic	85	15
Plăcile Peyer	95	5

grupări polare de tipul „bonetelor" („cap"). Redistribuirea este urmată de internalizarea Ig prin pinocitoză și dispariția lor de pe suprafața celulară. Dacă limfocitele care au pierdut Ig membranare sînt menținute în culturi, ele reapar treptat, inițial la un pol al celulei pentru a difuza ulterior pe întreaga suprafață a acestora. Cinetica dispariției și apariției Ig este în mare măsură asemănătoare celei de schimbare a Ig în celulele netratate și procesului de turnover al componenților membranari, în general, ceea ce sugerează că ar constitui un fenomen general. Frecvența diferitelor izotipuri are unele particularități caracteristice, ilustrate în special prin asocierea frecventă a IgM și IgD, cu predominanța IgD pe celulele B în repaus, la multe specii (tabelul nr. 41).

* *Feritina* = metaloproteină, complex Fe — apoferitină (~ 2 000 — 3 000 atomi Fe/moleculă), g.m. ~ 700 000 dal ; Ø ~ 1 000 nm. Prezentă în organele hematopoetice, în special în splină. Rol în eritropoeză, fiind una din formele de stocare a Fe în organism. Electronoopacă. După legarea de un anticorp specific, folosită pentru evidențierea unor antigene de suprafață, pe microelectronografii.

Numărul moleculelor de Igm variază între 5×10^4 și 2×10^5 și este, în general, cu atît mai mic cu cît stadiul de diferențiere a celulelor B este mai avansat. Celulele B activate pierd Igm și dobîndesc receptori pentru factorii de diferențiere produși de celulele T_H.

Tabelul nr. 41

Frecvența diferitelor clase de Igm, pe celulele B din sîngele circulant la om (după date OMS, 1974)

	% mediu	limite
Total Ig	21	16–28
IgG	7,1	4,0–12,7
IgA	2,2	1,0– 4,3
IgM*	8,9	6,7–13,0
IgD*	6,2	5,2– 8,2
IgE	extrem de rar	
K	13,9	10,0–18,6
λ	6,8	5,0–9,3

* Frecvent asociate.

Markerii fenotipici neimunoglobulinici. Pe lîngă Ig legate de membrana celulară, celulele B prezintă o serie de antigene și receptori care pot fi identificați cu ajutorul anticorpilor monoclonali. Semnificația funcțională a unora nu este încă perfect cunoscută. În plus, în prezent, situația este complicată de unele rezultate neașteptate, ca, de exemplu, faptul că markerul CD21 este identic cu receptorul C3d și cu cel pentru virusul Epstein-Barr. Studiul markerilor celulelor B a demonstrat cinetica apariției lor în cursul ontogenezei acestora, precum și faptul că stadiile intermediare ale diferențierii sînt marcate de exprimarea schimbătoare a

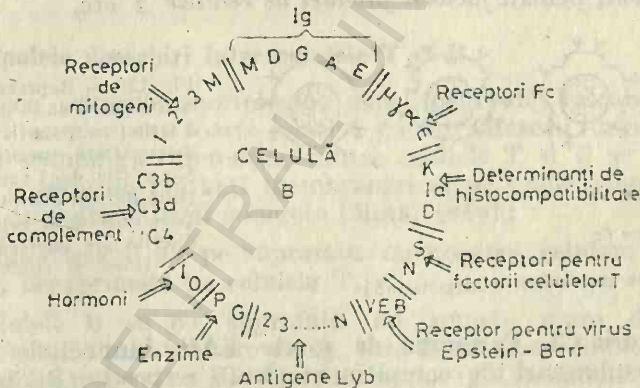


Fig. 125. — Reprezentare schematică a diferitelor molecule membranare prezente pe celulele B (după M. D. Cooper, Kearney și Scher, 1984).

diferite asortimente de proteine pe suprafața lor. Ele sînt implicate în interacțiunile dintre celulele B și alte celule, unele dintre ele avînd, în plus, o semnificație deosebită pentru diferențiere, creștere și migrare.

Utilizarea cu anumite precauții a diferiților markeri permite identificarea celulelor B și recunoașterea diferitelor etape ale diferențierii lor (fig. 125).

Antigenele Ia sînt glicoproteine polimorfe prezente pe suprafața celulară și codificate de genele CMH. Servesc ca elemente de recunoaștere în interacțiunile celulelor B cu limfocitele T activate de antigene și,

în consecință, sînt absolut necesare pentru activarea celulelor B. Celulele B imature IgMm+ din ficatul fetal, măduvă și splina șoarecelui nou-născut au numai puține molecule Ia detectabile. Ele apar mai ales la ~ 9 zile după naștere, cu o frecvență care crește cu vîrsta, pentru a atinge la șoarecele de două săptămîni 90% din frecvența de la adult.

Deși, în general, dezvoltarea celulelor B la om și la șoarece urmează o dinamică aproximativ asemănătoare, moleculele de antigene HLA—DR (analoge celor Ia de la șoarece) sînt prezente atît pe celulele pre-B, cît și pe celulele B. Exprimarea lor diminuă marcat pînă la dispariție pe măsura diferențierii spre plasmocit.

Receptorii pentru Fc a IgG. Celulele B poartă receptori pentru regiunea Fc a IgG (RFc), capabili să lege complexele antigene — anticorp și, în general, agregatele de Ig, dar nu și regiunile Fc ale IgG native. Detectarea lor se poate face cu ajutorul complexelor imune marcate radioactiv sau al Ig agregate la cald (63°C), marcate cu fluorocrom. Evidențierea lor ca test de identificare a celulelor B are o valoare îndoielnică pentru că : 1) nu toate celulele B poartă RFc (fig. 126 ; 2) RFc sînt prezenți și pe alte tipuri de celule ca monocitele, macrofagele, granulocitele, celulele K, timocitele și celulele T activate.

Celulele B au și alte tipuri de receptori ca, de exemplu, *RVEB* (pentru virusul Epstein-Barr) la om, *receptorii de mitogeni*, pentru *insulină* și alți *hormoni*, pentru *factorii produși de celulele T* etc.

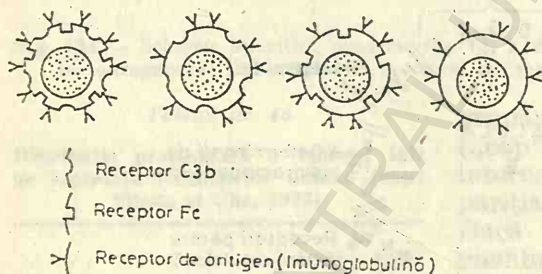


Fig. 126. — Reprezentare schematică a patru clase de celule B, cu diferite combinații de receptori de suprafață, specifici celulelor B. Nu se știe dacă aceste celule rezultă din căi distincte de diferențiere sau dacă reprezintă stadii diferite ale unei căi unice (după Hood și colab., 1984).

Receptorii C3. Formarea de rozete EAC. Limfocitele B posedă receptori membranari de complement (RC3, respectiv RC3b și RC3d), a căror prezență poate fi demonstrată prin producerea de rozete cu ajutorul eritrocitelor bovine, care nu se leagă spontan de nici un tip de limfocite umane.

Rozetele EAC (*E*ritrocite — *A*nticorpi — *C*omplement) se obțin cu hematii acoperite cu anticorpi antieritrocitari și complement. Tehnica necesită utilizarea obligatorie a anticorpilor din clasa IgM, care nu se pot lega de receptorii Fc pentru IgG ai limfocitelor, și a unor doze de complement care nu determină liza hematiilor (eventual ser deficitar în C5). Media celulelor care produc rozete EAC este de 15,5% (10—19%). Rezultatele trebuie interpretate cu precauție, deoarece receptorii C3 sînt prezenți pe celulele fagocitare (monocite și granulocite).

Limfocitele care poartă receptori C3 aparțin celulelor B, deoarece : 1) sînt absente în timus ; 2) sînt prezente în număr anormal de mare la șoarecele „nud" sau timectomizat la naștere ; 3) sînt insensibile la acți-

unea serurilor anti-T. De menționat, totuși, că dacă toate limfocitele care poartă receptorii C3 aparțin clasei B, nu toate limfocitele B au receptori de C3.

Deși repertoriul clonal al celulelor B este neîndoielnic amplificat și modificat în tot cursul vieții postnatale, este probabil că la naștere cele mai multe animale dispun de întregul complement de celule B, corespunzînd tuturor izotipurilor, în așa fel încît, virtual, orice determinant antigenic pătruns în organism va putea reacționa cu mai multe celule care poartă receptori complementari. Evident, există diferențe de la o specie la alta, mai mult sau mai puțin evidente. Vogler și Lawton (1985), pe baza cineticii apariției celulelor B și T în țesuturile limfoide periferice, consideră că șoarecele nou-născut ar fi echivalent ca dezvoltare imunologică cu fătul uman de 12—14 săptămîni.

Deși în infecțiile intrauterine congenitale fătul produce anticorpi decelabili în săptămîna a 20-a de gestație, nivelul de anticorpogeneză caracteristic adultului este atins numai după cîțiva ani. Nu se cunosc cauzele imaturității imunologice a copiilor. Reactivitatea diferită a adulților poate fi atribuită unor cauze complexe care includ : 1) stadiul de maturare al celulelor T, care cooperează în producerea răspunsului în IgA și IgG ; 2) starea dinamică a celulelor T și B supuse „bombardamentului" continuu cu antigene din mediu, care afectează diferențiat, subpopulațiile de celule.

Principalele deosebiri între celulele T și B

Deoarece criteriile morfologice sînt lipsite de valoare (în cazul microscopiei fotonice) sau foarte relative și contradictorii (în cel al electronografiei în scanning), diferențele dintre celulele T și B se bazează, în special, pe o serie de markeri membranari și pe unele comportamente specifice în anumite situații concrete (Moța, 1986) :

1) Limfocitele B au pe suprafața membranei celulare o serie de aloantigene, neexprimate pe celulele T.

2) Celulele B au pe suprafață un număr mare de molecule (~ 100 000/celulă) membranare de Ig, care definesc specificitatea imunologică a celulelor respective. Ele aparțin claselor IgM (monomer) și/sau IgD.

3) Celulele B poartă receptori pentru porțiunea Fc a altor molecule de Ig, aparținînd unei anumite subclase de IgG (la șoarece IgG_1). Funcția lor este necunoscută : ar putea acționa ca structuri accesorii, care favorizează concentrarea antigenelor pe suprafața celulelor B.

4) Celulele B au receptori membranari pentru subunitatea C3b a complementului. Ei ar permite concentrarea complexelor solubile antigen — anticorp, care au fixat complementul pe suprafața celulelor B.

5) Celulele T și B răspund în mod diferit la acțiunea stimulatoare nespecifică a lectinelor. Astfel, celulele B sînt insensibile la acțiunea fitohemaglutininei și concanavalinei A, foarte active pe celule T. În schimb, leagă eficient și sînt activate de mitogeni de tipul lipopolizaharidelor de la *E. coli* (antigene timus-independente). Celulele B pot fi inactivate de anticorpi anti-Ig, care se leagă de Ig de membrană.

6) Celulele B, fiind puțin mai mici și mai dense, pot fi separate de celulele T în raport de viteza de sedimentare în cîmp centrifugal sau gravitațional. Ele aderă mai puternic de suprafețele de sticlă sau de nylon, astfel încît sînt reținute în cursul trecerii prin coloane cu fibre de nylon, care lasă să treacă nestingherite celulele T.

7) Limfocitele T ale unor specii animale produc rozete eritrocitare după legarea hematiilor heterologe pe suprafața lor. Testul este util pentru identificarea celulelor T umane.

8) Celulele T și B recunosc antigenele în mod diferit. Limfocitele B recunosc atît antigenele libere, cît și pe cele legate de un imunoabsorbant. Celulele T răspund numai la antigene legate de celule, prin intermediul receptorului celular de antigen Ti, în asociere cu produșii genelor CMH. Această particularitate este utilizată în practică pentru separarea celor două tipuri de celule.

Plasmocitele și celulele B cu memorie

După stimularea de către antigene sau substanțe mitogene, celulele B pot evolua pe două căi:

1) diviziune celulară și diferențiere pînă la stadiul terminal de *plasmocit* celulă care secretă anticorpi;

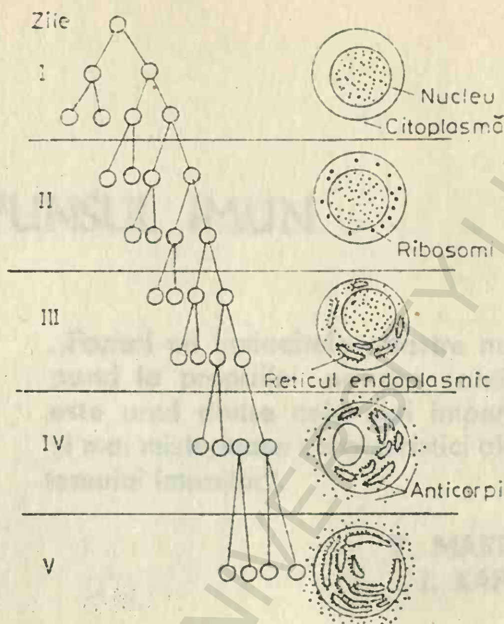
2) diviziune, cu revenire la starea de repaus, ca limfocite B mici, postmitotice, cu viață lungă, sau ca *celule cu memorie*, care se pot diferenția rapid în plasmocite, la un al doilea contact cu același antigen.

Plasmocitele reprezintă deci ultimul stadiu de diferențiere al celulelor B. Derivarea lor din limfocitele mici a fost demonstrată de Gowans (1962), care a infuzat limfocite marcate radioactiv în sînge la șobolani și a regăsit izotipul în celulele cu morfologie de plasmocit. Între limfocitul B activat (limfoblastul B) și plasmocit se interpune stadiul de *plasmoblast* *, definit structural și funcțional. El are dimensiuni mai mari și un raport nucleu/citoplasmă superior celui ale plasmocitelor. Poartă încă pe suprafață molecule de Ig membranare (receptori de antigen) și receptori pentru Fc a IgG. Este capabil să secrete mici cantități de Ig și ar fi important pentru producerea anticorpilor în fazele timpurii ale răspunsului imun. Plasmoblaștii persistă puțin timp, după care încep să se dividă, formînd celule diferite morfologic de cele parentale. Fiecare ciclu de diviziune produce celule cu citoplasmă progresiv îmbogățită în ribosomi. După ~ 8 generații de celule, adică la ~ 5 zile de la contactul cu antigenul, apar plasmocitele (fig. 127).

Plasmocitele sînt celule ovoidale, cu nucleu excentric, colorat inegal, cu aspect de spițe de roată, cu un complex Golgi bine dezvoltat, o rețea extinsă de reticul endoplasmatic și o citoplasmă intens bazofilă. Spre deosebire de celulele din care provin, în general, nu au molecule de Ig

* În afară de „plasmoblaști" au fost descrise mai multe stadii, intermediare între celulele B și plasmocite, diferite morfologic, denumite *imunoblast*, *centroblast* și *centrocite* (Zola, 1985).

Fig. 127. — Stadiile succesive ale dezvoltării unui plasmocit matur, după stimularea de către un antigen (după Nossal, 1969).



pe suprafață, nici receptori Fc IgG, C3b sau VEB detectabili. Au în schimb două antigene membranare caracteristice : *PCA-1* („Plasma cell antigen"), prezent și în creier, rinichi și ficat, avînd g.m. ~ 110 000 dal, și *PCA-2*, limitat la acest tip de celule.

Plasmocitele sînt rar prezente în circulație. Sînt întîlnite în medulara ganglionilor limfatici, pulpa roșie splenică, lamina propria a țesutului limfoid respirator (BALT) și gastrointestinal (GALT), și în sinusoidele măduvei. În timp ce în celulele B ~ 80—90% din moleculele de Ig sintetizate sînt depuse pe membrana celulară, ca receptori de antigen, în cazul plasmocitelor > 90% sînt secretate. Capacitatea de sinteză a plasmocitelor este foarte mare. Ele pot produce 2 000—10 000 molecule de Ig/secundă. Anticorpii produși au aceeași specificitate ca și moleculele Ig membranare ale clonei de celule B din care provin plasmocitele.

Celulele B cu memorie provin din celule B mature, care, după stimulare de antigene și de celulele T_H, nu suferă diferențierea la plasmocit, ci revin la stadiul de limfocit mic, cu viață lungă (luni sau ani). Ele prezintă o heterogenitate considerabilă sub raportul mărimii celulei, al izotipului Ig de suprafață (membrană), al exprimării antigenelor Ia. Majoritatea celulelor cu memorie pierd capacitatea de a exprima IgDm, iar unele pot pierde și receptorii Fc și C3. Celulele din sîngele circulant care exprimă pe suprafața lor alte Ig, diferite de IgM și IgD, sînt probabil celule cu memorie, deoarece diferitele combinații de izotipuri exprimate indică subpopulații de celule cu memorie. Ele au proprietatea de a fi mai ușor stimulate decît celulele virgine, dacă se reîntilnesc cu același antigen și, împreună cu celulele T cu memorie, determină răspunsul imun secundar.

RĂSPUNSUL IMUN

„Faptul că limfocitele noastre nu răspund la propriile noastre antigene este unul dintre cele mai importante și mai misterioase caracteristici ale sistemului imunitar".

P. MARRACK
J. KAPPLER

„Producerea anticorpilor nu este un proces lamarckian, ci unul darwinian. Ea nu pune în joc un mecanism didactic, ci unul selectiv".

F. JACOB

„Un aspect esențial al funcției anticorpilor este repertoriul aparent nelimitat al specificităților lor de legare a antigenelor".

R. HUBER

Răspunsul imun

(Pl. 21—25)

„Evenimentul critic în declanşarea unui răspuns imun este recunoaşterea markerilor biochimici care deosebesc self de nonself"

S. Tonegawa

Răspunsul imun este reprezentat de ansamblul fenomenelor declanşate de interacţiunea specifică a celulelor sistemului imunitar cu antigenele. El implică punerea în acţiune a celulelor imunocompetente reactive la antigen, capabile de proliferare şi diferenţiere, şi apariţia a diferite tipuri de celule efectoare şi cu memorie. În acelaşi timp, desfăşurarea răspunsului imun implică participarea unor celule zise „accesorii" (macrofage, celule dendritice, celule fixe, celule sanguine), care au, în realitate, un rol esenţial în prelucrarea şi „prezentarea" antigenelor, precum şi în producerea şi eliberarea unor substanţe ce influenţează diferitele manifestări ale răspunsului imun (fig. 128).

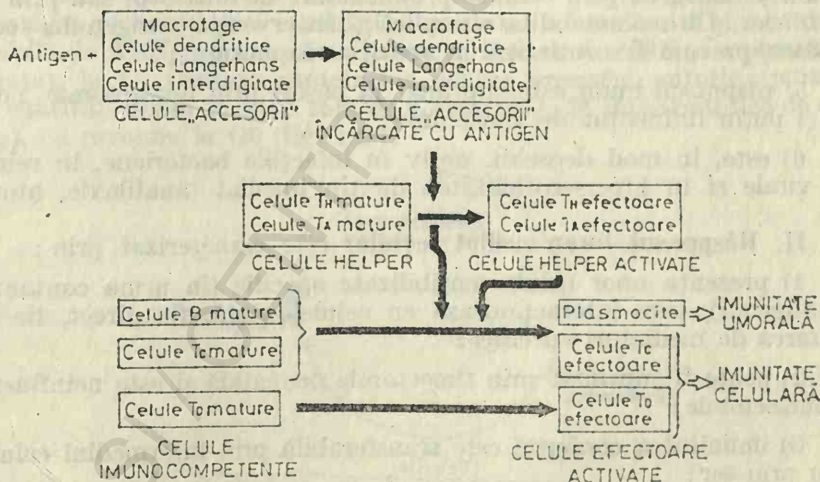


Fig. 128. — Celulele implicate în răspunsul imun mediat umoral şi celular.

Răspunsul imun este un proces *adaptativ*, remarcabil de versatil, prin care organismul poate să declanşeze un sistem defensiv specific, ca răspuns la o varietate imensă de molecule, macromolecule şi celule străine. Iniţierea lui are loc la nivelul organelor limfoide secundare, special adaptate pentru a primi limfocitele circulante din sînge, dirijîndu-le în situsuri

specifice de interacțiune cu celulele accesorii, încărcate cu antigene. Întîlnirea dintre antigenul exogen străin și celulele imunocompetente corespunzătoare declanșează o adevărată cascadă de interacțiuni celulare și moleculare complexe, cu rol fundamental în apărarea organismului. Reacțiile răspunsului imun sînt puternic amplificate pe parcursul desfășurării lor, prin proliferarea intensă a unora din celulele participante, prin maturarea și diferențierea lor care le conferă proprietăți efectoare superioare celor ale precursorilor lor și prin producerea de substanțe biologic active (mediatori farmacologic activi, anticorpi etc.).

Tipurile de răspuns imun

În mod convențional, au fost descrise două tipuri de răspuns imun:

I. **Răspunsul imun mediat umoral** este caracterizat prin:

1) apariție consecutivă răspîndirii antigenelor în organism;

2) prezența în sîngele circulant a anticorpilor capabili să producă *in vivo* inactivarea virusurilor, neutralizarea toxinelor, opsonizarea bacteriilor, iar *in vitro*, reacții antigen — anticorp;

3) interacțiunea dintre antigen și anticorp are loc în situsuri diferite de poarta de intrare a antigenelor în organism, ca și de locul de sinteză a anticorpilor;

4) imunitatea conferită este transferabilă prin intermediul serului sanguin și mai greu prin celulele producătoare de anticorpi sau prin precursorii lor. Ultima modalitate implică și intervenția antigenului corespunzător, precum și o întîrziere în apariția răspunsului;

5) răspunsul imun este suprimat la păsări prin bursectomie neonatală și puțin influențat de timectonie;

6) este, în mod deosebit, activ în infecțiile bacteriene, în reinfecțiile virale și în hipersensibilitatea de tip imediat (anafilaxie, atopie).

II. **Răspunsul imun mediat celular** este caracterizat prin:

1) prezența unor celule sensibilizate specific (în urma contactului cu antigenul), care interacționează cu celulele-țintă, fie direct, fie prin eliberarea de mediatori specifici;

2) poate fi suprimat prin timectomie neonatală și este neinfluențat de bursectomie;

3) imunitatea conferită este transferabilă prin intermediul celulelor și nu prin ser;

4) este produs, în special, de antigene care rămîn la poarta de intrare în organism (de exemplu, grefele);

5) interacțiunea dintre celulele efectoare și antigenele „țintă" are loc la poarta de intrare sau la locul producerii răspunsului imun;

6) este în mod deosebit eficient în infecțiile virale și fungice, în infecțiile bacteriene intracelulare (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*,

Listeria, Brucella etc.), în imunitatea antitumorală, în respingerea transplantelor alogenice, în hipersensibilitatea de tip întîrziat etc.

Demonstrarea funcţiei de opsonizare a anticorpilor a evidenţiat caracterul artificial al acestei separări, utilizată iniţial pentru caracterizarea unor fenomene care se deosebeau prin conotaţiile lor bacteriologice. Această idee a fost consolidată de evidenţierea faptului că anticorpii sînt produşi de celule, că multe din efectele lor sînt dependente de celule, că în imunitatea mediată celular participă numeroşi mediatori solubili, precum şi de probele numeroase privind interacţiunile sinergice ale celor două laturi ale răspunsului imun. Cu toate acestea, această separare, consacrată prin uz, este menţinută, probabil pentru că are avantajul de a reflecta diferenţele dintre celulele efectoare directe, respectiv limfocitele B în imunitatea umorală şi celulele T în cea mediată celular.

Terminologie

Limfocit în repaus („Resting lymphocyte" — celulă aflată în afara ciclului celular (G0), avînd o activitate metabolică scăzută, la „nivelul de bază" al sintezei de ARN şi de proteine, necesar pentru menţinerea funcţiilor vitale (sinteza de ADN este absentă). Celulele antigen-reactive sînt în faza de repaus, care este stabilă pînă la apariţia semnalului activator.

Ciclul celular — trecerea celulelor care se vor divide de la starea G0 la faza G1 (sinteza enzimelor necesare pentru replicarea ADN asociată cu prezenţa unei cantităţi normale de ADN diploid şi o cantitate variabilă de ARN), apoi succesiv la starea S (sinteza ADN şi a proteinelor asociate), la G_2 (sinteza proteinelor pentru aparatul mitotic; prezenţa unei cantităţi duble de ADN faţă de normal) şi la M (faza mitotică de diviziune), cu revenire la G0 (fig. 129).

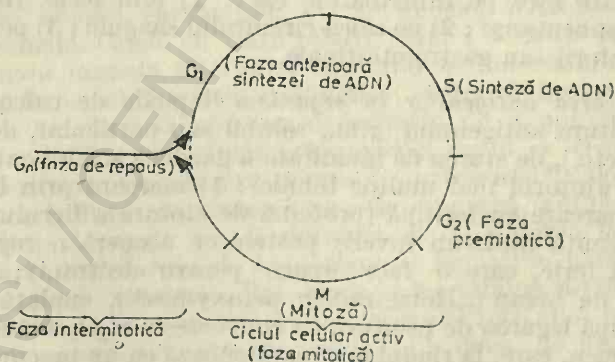


Fig. 129. — Reprezentare schematică a ciclului mitotic al celulei eucariote, animale bazată pe acţiunea agenţilor toxici cu specificitate de fază (după Webb jr. şi Winkelstein, 1984).

Transformarea limfocitelor (Nowel, 1960) — termen ce caracterizează modificările morfologice rezultate cînd limfocitele mici, în repaus, se transformă în limfoblaste, prin expunere la mitogeni.

Blastogeneză (transformare blastică) — procesul de formare în culturi de limfocite, *in vitro*, a unor celule mari de tip blast, pironinofile, sub acțiunea antigenelor sau a mitogenilor.

Etapele răspunsului imun

Declanșarea răspunsului imun, component cu importanță fundamentală a sistemelor naturale de apărare a organismului la mamifere, se realizează în următoarele etape succesive: 1) întîlnirea cu antigenul; 2) discriminarea self — nonself; 3) recunoașterea specifică a componentului nonself; 4) activarea celulelor efectoare; 5) desfășurarea răspunsului imun; 6) reglarea lui.

Întîlnirea antigenului cu celulele sistemului imunitar

Etapă cu importanță fundamentală, întîlnirea agenților patogeni sau a produșilor lor cu celulele efectoare ale răspunsului imun are loc prin mecanisme precise și complexe care dirijează antigenele și celulele în situsuri în care oportunitatea „întîlnirii" este optimizată.

Această etapă are mai multe faze care implică: 1) pătrunderea antigenului în organism și localizarea lui în situsuri privilegiate; 2) prelucrarea lui de către celulele „accesorii" ale răspunsului imun la molecule mai mici imunogene; 3) „prezentarea" antigenelor către limfocitele efectoare.

Pătrunderea antigenelor în organism

Se poate face pe următoarele căi: 1) prin piele, respectiv intradermic sau subcutanat; 2) pe calea circuitului sanguin; 3) pe calea mucoaselor respiratorii sau gastrointestinale.

Localizarea antigenelor în organism depinde de calea de administrare, de natura antigenului (g.m., solubil sau particulat, de valoarea lui imunogenă etc.), de starea de imunitate a gazdei ș.a. Ea poate fi urmărită, *in vivo*, cu ajutorul mai multor tehnici: 1) marcare prin imuno-fluorescență; 2) marcare cu feritină (proteină de stocare a fierului, prezentă în splină, alcătuită dintr-un înveliș proteic ce acoperă o regiune centrală de hidroxid feric, care o face opacă pentru electroni); 3) marcare cu peroxidază de hrean („Horse-radish peroxydase"), cuplată cu anticorpi specifici (după legarea de țesuturi, ea convertește H_2O_2 adăugat la radicali liberi de oxigen, care, la rîndul lor, reacționează cu un precursor cromogen, ca 3,3'-diamino-benzidina sau 4-clor-1-naftolul, pentru a forma un precipitat colorat insolubil; 4) prin marcare cu radioizotopi (^{125}I, ^{131}I, ^{14}C, ^{35}S, ^{3}H etc.); 5) detectarea antigenității diferitelor extracte de organe, prin inocularea la organisme normale.

Antigenele care pătrund *prin epitelii* (*per cutan*) sînt capturate în ganglionii limfatici regionali, în macrofagele din regiunea medulară și în celulele dendritice din foliculii limfoizi.

Antigenele introduse *subcutanat*, în spaţiile intercelulare, sînt vehiculate, după o perioadă de staţionare locală, în ganglionii sateliţi, care drenează regiunea respectivă pe calea vaselor limfatice aferente. Ele pătrund în sinusul marginal şi de aici în sinusurile medulare unde sînt regăsite în macrofage. După 1 — 2 ore, concentraţia antigenelor în regiunea medulară a ganglionilor este maximă. În funcţie de natura antigenelor şi de doza injectată, ele pot persista zile sau luni incluse, frecvent, într-o acumulare de limfocite. Localizarea antigenelor pe suprafaţa celulelor dendritice ale foliculilor s-ar produce mai tîrziu şi ar fi semnificativă, după Mota (1986), mai ales pentru răspunsul imun secundar.

Antigenele care pătrund pe calea *circuitului sanguin* sînt „capturate" iniţial pe suprafaţa celulelor reticulare din zona marginală şi a celulelor dendritice din splină. Ele sînt „filtrate" de macrofagele din ficat şi plămîn, dar răspunsul imun este indus în splină. Autoradiografiile secţiunilor de splină, efectuate la intervale diferite după injectarea antigenului, sugerează că acesta este percolat continuu din zona marginală spre pulpa albă, spre foliculii limfoizi, în care este reţinut timp mai îndelungat. Pentru cele mai multe antigene, foliculii limfoizi reprezintă sediul principal în care are loc concentrarea antigenelor, zona marginală fiind importantă pentru o concentrare tranzitorie.

Antigenele pătrunse pe *cale respiratorie* sau *gastrointestinală* sînt concentrate, după caz, în ganglionii limfatici locali, amigdale, vegetaţii adenoide, apendice sau plăcile Peyer.

Eliminarea parţială a antigenelor

Cele mai multe antigene introduse în organism sînt parţial eliminate înainte de a putea induce un răspuns imun. Aceasta explică prezenţa lor în regiuni lipsite de celule formatoare de anticorpi sau absenţa lor din regiuni întregi ale ţesutului limfoid. Astfel, s-a demonstrat că celulele Kupffer din ficat, situate la interfaţa cu sîngele, sînt primele fagocite mononucleare expuse contactului cu antigenele, pătrunse, în special, pe cale intestinală. Celule cu viaţă relativ lungă ($\sim$ 20 de zile), ele au ca funcţie primară ingestia diferitelor substanţe străine solubile şi particulate din sîngele portal (bacterii, endotoxine, complexe imune solubile etc.) şi eliminarea lor. Deşi *in vitro* au capacitatea de a prezenta antigenele celulelor T, rolul lor în inducţia răspunsului imun *in vivo* este minor, datorită diferitelor constrîngeri impuse de anatomia şi fiziologia ficatului.

În general, după pătrunderea pe cale sanguină, antigenele sînt distruse cu atît mai repede cu cît dimensiunile şi puterea lor imunogenă sînt mai mari. Astfel, celulele bacteriene şi hematiile heterologe dispar în cîteva ore, fiind fagocitate. Proteinele serice străine persistă mai mult, eliminarea lor făcîndu-se în trei etape succesive: 1) una, relativ scurtă, de echilibrare cu spaţiile extravasculare; 2) a doua, de degradare lentă, fiziologică; 3) a treia, de degradare mai rapidă, legată de prezenţa anticorpilor. Final, indiferent de calea de pătrundere în organism, o cantitate relativ mică, dar suficientă pentru a declanşa răspunsul imun, ajunge în organele limfoide secundare. La nivelul acestora, întîlnirea cu celulele efectoare ale răspunsului imun este favorizată de viteza lentă de circulaţie, de structura întortocheată şi de dimensiunile extrem de fine ale capilarelor, precum şi de prezenţa celulelor care „prezintă" antigenele.

Preluarea şi înglobarea antigenelor

Legarea antigenelor se face în mod obişnuit prin mecanisme nespecifice determinate de interacţiunile necovalente (încă necunoscute) cu membrana celulară. Există şi posibilitatea unei legări specifice, asociată chiar cu o viteză de fagocitare mărită în cazul complexelor antigen — anticorp, care se pot fixa la nivelul receptorilor prezenţi pe suprafaţa celulelor.

Celulele „accesorii" ale imunităţii

Sub această denumire este cunoscut un grup heterogen de celule, care include, pe lîngă monocite şi macrofage, celulele Langerhans, celulele dendritice, celulele interdigitate şi histiocitele tisulare. Pentru cele mai multe a fost demonstrată capacitatea de a lega antigenele, uneori de a le îngloba, de a le prelucra şi de a le „prezenta" limfocitelor.

Prezente în toate ţesuturile, celulele „accesorii" se găsesc în concentraţia cea mai mare în organele limfoide, ca splina şi ganglionii limfatici, respectiv în situsurile în care populaţia celulară predominantă este formată din limfocite. Acestea circulă în organism şi revin în organele limfoide, favorizînd majoritatea întîlnirilor dintre antigene, celulele care „prezintă" antigenele şi limfocite. De asemenea, celulele „accesorii" sînt prezente în număr mare la nivelul porţilor de intrare în organism (piele, submucoasa gastrointestinală şi respiratorie) unde formează adevărate bariere în calea antigenelor pe care le preiau cu o mare eficienţă.

Celulele Langerhans din piele, unde reprezintă 2 — 8% din populaţia celulară sînt celule cu prelungiri citoplasmatice lungi, dendritice, care formează o reţea continuă. Conţin o incluziune specifică — numită granulaţia Birbeck — vizibilă numai la microscopul electronic, şi o proteină caracteristică numită pS 100 (Watanabe, 1983). Funcţia granulaţiei Birbeck nu este cunoscută, dar este posibil să fie implicată în prezentarea antigenelor.

Celulele Langerhans sînt singurele celule din piele care poartă pe suprafaţă receptori pentru regiunea Fc a IgG, pentru C3 şi exprimă antigene codificate de CMH, precum şi antigenul T_C, prezent şi pe timocite. Deşi sînt derivate din macrofagele medulare, nu au funcţii fagocitare sau acestea sînt slabe (Diaz şi Provost, 1984).

Celulele Langerhans, echivalent funcţional al macrofagelor în epidermă, au un rol esenţial în transmiterea informaţiei antigenice celulelor T şi în declanşarea răspunsului imun (fig. 130). Ele fixează antigenele pătrunse în piele, pe suprafaţa prelungirilor dendritice, după care migrează pe calea limfaticelor aferente, spre paracortexul ganglionilor limfatici regionali, unde se amestecă, în contact cu celelalte celule rezidente. În absenţa lor în piele nu pot fi iniţiate nici modificările caracteristice răspunsului imun în ganglioni şi nici reacţiile de hipersensibilitate locală întîrziată. Prin prezenţa celulelor Langerhans, sistemul imunitar dispune de elemente celulare active în captarea şi prezentarea antigenelor şi în crearea unui cadru de bază esenţial pentru sensibilizarea activă a limfocitelor, în regiunile cele mai periferice ale organismului.

Celulele dendritice sînt celule cu prelungiri citoplasmatice lungi şi ramificate, legate între ele prin sisteme joncţionale de tipul desmosomilor (Gerdes, 1983). După Neveu (1986), nu se ştie dacă reprezintă un tip nou de celule, cu biologie aparte, sau dacă sînt macrofage în stadii neobişnuite de diferenţiere. După unii autori ar reprezenta un tip special de celule reticulare.

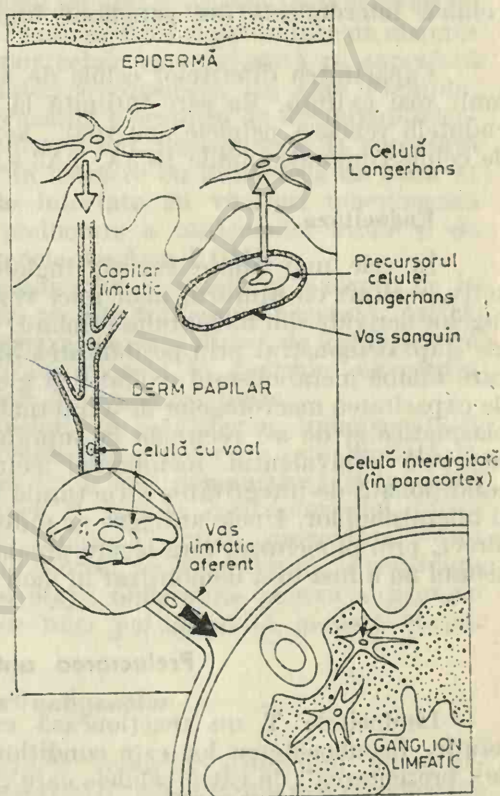


Fig. 150. — Circulaţia celulelor Langerhans din piele în ganglionii limfatici regionali. Celulele Langerhans părăsesc în mod obişnuit pielea, adesea „încărcate" cu antigen, pentru a trece în limfaticele aferente unde îşi schimbă morfologia şi apar sub forma celulelor cu „văl" („veiled cells"). Acestea transportă antigenul la celulele T în regiunea paracorticală a ganglionilor limfatici, unde formează celulele interdigitate (după Male, Champion şi Cooke, 1987).

Morfologia lor şi natura markerilor de suprafaţă pot diferi în funcţie de localizare. Sînt lipsite de putere fagocitară. Celulele dendritice au un rol important *in vivo* în iniţierea răspunsului imun. Ele formează după Mota şi colab. (1986), o reţea complexă, ca o pînză de păianjen, tridimensională în centrii germinativi ai ganglionilor limfatici şi în foliculii limfoizi din diferite ţesuturi. Antigenele ajunse în apropiere sînt legate de suprafaţa lor, la nivelul receptorilor, pentru a fi păstrate perioade îndelungate sau concentrate în spaţiile labirintice.

Celulele interdigitate sînt foarte asemănătoare celulelor Langerhans. Sînt prezente în special în timus, în zona corticală profundă a ganglionilor limfatici, în zonele T dependente ale splinei (Ducastelle, 1981). Au un nucleu alungit, neregulat, o citoplasmă bogată, cu prelungiri care

se întrepătrund ca degetele de la două mîini. Pe membrana citoplasmatică poartă aceiași receptori ca și celulele Langerhans, și proteina pS 100.

Apartenența celulelor „accesorii" la seria fagocitelor mononucleare este contestată de mulți cercetători. Cu toate acestea, existența unor proprietăți comune sugerează că ar fi înrudite, evoluția lor desfășurîndu-se, probabil, după următorul scenariu : monocitul sanguin → celulele Langerhans din piele → celulele „cu voal" („Veiled cells") din limfa aferentă → celulele interdigitate din ganglionii limfatici.

Capacitatea diferitelor celule de a prezenta antigenele *in vitro* este mult mai extinsă. Ea este întîlnită la celulele Kupffer din ficat, unele endotelii venoase, celulele „cu voal", keratinocitele din piele și unele linii de celule tumorale (liniile BC3A, TA3 ș.a.) (Sharma, 1986).

Endocitoza

În cele mai multe cazuri, înglobarea antigenelor este un proces activ, realizat cu ajutorul unor mici vezicule, legate de suprafața macrofagelor derivate din membrana celulară. Procesul necesită consum de energie (fapt demonstrat prin posibilitatea blocării lui cu ajutorul substanțelor care inhibă metabolismul oxidativ și glicoliza). Endocitoza este facilitată de capacitatea macrofagelor de a internaliza rapid constituenții membranei plasmatice și de a-i recircula la suprafață (în ~ 30 minute acest proces recirculă echivalentul membranei celulare totale). Recircularea este condiționată de integritatea structurală și funcțională a microfilamentelor și microtubulilor. Unele antigene ar putea pătrunde în celulele „accesorii" direct, prin pinocitoză, fără legare prealabilă de suprafața celulară (Mecanismul nu a fost însă demonstrat în mod riguros).

Prelucrarea antigenelor

Limfocitele T nu reacționează cu antigenele naturale aflate în soluție. Recunoașterea lor este condiționată de prelucrarea prealabilă și de „prezentarea" de către celulele care „prezintă" antigenele. Deși există numeroase date experimentale, detaliile mecanismului molecular de clivare, transport și menținere a antigenelor pe suprafața celulelor sînt abia în curs de descifrare.

Prelucrarea antigenelor („Antigen processing") ar avea loc la nivelul fagolizosomilor, rezultați din fuziunea veziculelor de endocitoză care conțin antigenele cu lizosomii bogați în proteaze, glicozidaze, nucleaze și alte enzime degradative. Importanța acestei faze este demonstrată de faptul că neutralizarea conținutului acid al veziculelor, blocarea proteolizei sau orice alt procedeu care împiedică prelucrarea antigenelor suprimă stimularea celulelor B.

Nu a fost elucidat mecanismul specificității proteazelor, care fac prelucrarea antigenelor și nici modul în care ele lasă intactă regiunea imunogenă, care urmează a fi transportată la suprafața celulei. După Wiener (1973), ~ 90 % din antigenele înglobate sînt catabolizate rapid

(în 2 — 6 ore), restul fiind reţinute în macrofage, într-o formă rezistentă la degradare rapidă şi la eliminare. Ele sînt păstrate calitativ neschimbate, astfel încît imunogenitatea asociată cu macrofagul poate dura perioade mai îndelungate, deşi scade progresiv în timp.

Prelucrarea antigenelor la peptide scurte (în general, > de 9 — 10 resturi de aminoacizi) a fost demonstrată de Babbit şi colab. (1985) pentru lizozim şi de Townsend şi colab. (1985, 1986) pentru nucleoproteina virusului gripal. De Lisi şi Berzofsky (1985) au arătat că peptidele respective, sintetizate chimic, pot fi „prezentate" imunocitelor şi pot induce un răspuns imun specific dacă sînt adăugate unor celule care prezintă pe suprafaţă molecule CMH. Pe baza acestor date, se consideră că, spre exemplu, lizozimul înglobat de macrofage activează un mecanism de degradare selectivă intracelulară, iar peptidele rezultate sînt transportate la suprafaţă pentru a fi prezentate celulelor T_{H}, în asociere cu antigenele de clasa II CMH. În mod asemănător, celulele infectate cu virusuri reacţionează activînd un mecanism selectiv de prelucrare a antigenelor virale şi de prezentare a lor în asociere cu antigenele de clasa I CMH.

Walden şi colab. (1986) au demonstrat că există şi excepţii de la această regulă, în sensul că proteoliza nu este totdeauna necesară. Astfel, citocromul *c* nativ şi lactic dehidrogenaza, cuplate direct de fosfolipide cu ajutorul reactivilor bifuncţionali şi încorporate în vezicule ce conţin antigen Ia, stimulează specific celulele T corespunzătoare.

Degradarea parţială a antigenelor, cu menţinerea imunogenităţii este un proces relativ rapid. Prelucrarea antigenelor nu este limitată la antigenele celulare sau corpusculare. Ea a fost demonstrată şi în cazul hemocianinei KHL („Keyhole limpet")* pentru care intervalul dintre înglobarea ei şi detectarea de către celulele T, după „prezentare", este de 45 — 60 minute, ca şi în cel al ovalbuminei. În general însă, se consideră că prelucrarea fagolizosomală este o etapă obligatorie pentru antigenele particulate complexe, cele peptidice mici putînd evita această etapă.

„Prezentarea" antigenelor

Macrofagele „prezintă" antigenele celulelor sistemului imunitar, în asociere cu moleculele Ia codificate de CMH. Acest fapt a fost demonstrat de Friedman şi colab. (1983), care au evidenţiat prezenţa unor complexe antigen „prelucrat" — molecule Ia, în mediul de cultură al macrofagelor stimulate.

În general însă, legătura dintre antigen şi structurile celulei care prezintă antigenul este relativ puternică. Spălarea intensivă a celulelor, ca şi dializa membranelor celulare, după ce au fost incubate o perioadă de timp cu antigenul prelucrat nu îndepărtează activitatea stimulatoare (Pierce şi Margoliash, 1988). Asocierea antigenelor cu macrofagele măreşte mult imunogenitatea antigenelor slabe. În cazul antigenelor puternice, efectul este mai puţin evident sau chiar negativ (Saito, 1983).

---

*Hemocianina Keyhole limpet = complex macromolecular proteic, purtător de O_2, extras din hemolimfa unor moluşte gasteropode din familia *Fissurellidae*. Cele mai mari, *Grant keyhole limpet* (*Megathura crenulata*) sînt prezente în California.

Deși datele experimentale pledează fără echivoc pentru legarea antigenelor de membrana celulelor care le prezintă, pînă în prezent nu au fost aduse probe directe, în sensul izolării peptidelor antigenice de pe suprafața membranelor celulare care au prelucrat antigenul. Cu toate acestea, Buus și colab. (1987) au demonstrat capacitatea peptidelor antigenice de a se lega în special de moleculele Ia.

După Watts și McConnell (1987), prezentarea eficientă și inițierea stimulării celulelor T necesită formarea unor șiruri de complexe trimoleculare (molecula Ia, peptidul imunogen și receptorul T), la interfața dintre celulele care prezintă antigenul și celulele T cu care interacționează. Stabilitatea acestor complexe multicomponente implicate în activarea specifică a celulelor T depinde de afinitatea lor de legare și de concentrațiile componenților disponibili ce interacționează pe suprafața celulei. În prezența unor concentrații mari de peptid antigenic, așa cum se întîmplă experimental, prezența moleculelor Ia încorporate în membrană este suficientă pentru a iniția activarea celulelor T. La concentrații mici de peptide antigenice, cum este cazul în organism, este necesară intervenția unor componenți auxiliari, care măresc eficiența procesului, prin stabilizarea complexului stimulator. În acest sens, Pierce și Margoliash (1987, 1988) acordă o semnificație deosebită unui peptid nespecific, identificat de ei, PBP 72/74, de pe suprafața celulelor care prezintă antigenele. Rolul lui în legarea peptidelor antigenice este demonstrat de faptul că serurile imune anti-PBP 72/74 blochează prezentarea antigenelor către celulele T.

În cazul celulelor dendritice, antigenele sînt fixate pe suprafața prelungirilor lor citoplasmatice. Rolul acestor celule ar fi, în special, de a concentra antigenele într-o localizare strategică, favorabilă contactului cu celulele imunocompetente.

Rolul limfocitelor B în prelucrarea și „prezentarea" antigenelor

Celulele B normale și neoplazice Ia-pozitive au capacitatea de a „prezenta" antigenele celulelor T. Această „prezentare" de către celule B nespecifice se supune acelorași reguli valabile în cazul macrofagelor și al altor celule ce prezintă antigenul. În ultimii ani, Benacerraf, Rock și Abbas (1984), precum și Lanzavecchia (1985) au evidențiat rolul leucocitelor B specifice în prelucrarea și prezentarea antigenelor. Moleculele de Ig specifice pentru antigen prezente pe suprafața lor pot servi pentru legarea antigenului, internalizarea și prelucrarea lui în veziculele acide urmate de reapariția la suprafața celulei în asociere cu moleculele CMH de clasa II (fig. 131). Pierce și Margoliash (1985, 1988) au confirmat rolul esențial al celulelor B în facilitarea prelucrării antigenelor în condiții fiziologice, decurgînd din capacitatea lor de a concentra antigenele din soluție și de a le internaliza eficient. Pentru a demonstra importanța relativă a diferitelor structuri, Casten și Pierce (1988) au legat covalent același antigen de molecule de clasele I și II (Ia) codificate de CMH, precum și de Ig de membrană (Igm). Ei au demonstrat că antigenele legate de Ig sînt prelucrate mult mai eficient, deși legarea de moleculele CMH este, la rîndul său, mai eficientă decît în cazul antigenelor libere. Datorită specificității lor de acțiune și efectului de concentrare, celulele B pot

prezenta eficient antigenele chiar cînd acestea se găsesc în concentrații de 1 000 — 10 000 de ori mai mici decît cele necesare pentru prezentarea de către macrofage. Pe baza acestor date s-a consolidat opinia că limfocitele B, care exprimă Ig specifice pentru in antigen pe suprafața lor, sînt de departe celulele cele mai eficiente un prelucrarea și prezentarea antigenelor (Pierce și Margoliash, 1988; Ashwell, 1988).

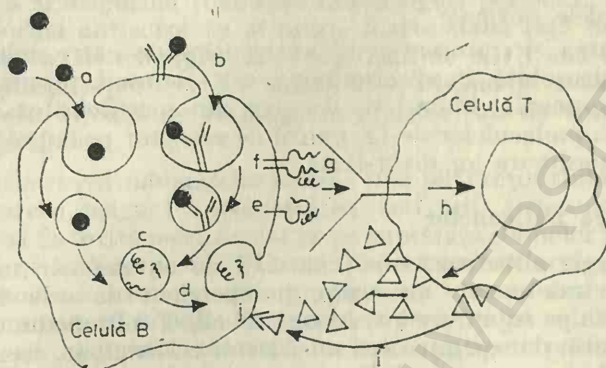


Fig. 131. — Prelucrarea antigenelor în celulele B și prezentarea lor unei celule T_H. Un antigen globular specific este înglobat nespecific de celulele B, pe calea veziculelor de pinocitoză (a) sau specific prin legarea lor de Igm de pe celulele B corespunzătoare (b). Antigenul internalizat este transportat în veziculele acide intracelulare (c) unde este clivat, iar peptidele rezultate sînt transportate la suprafața celulei (d). Peptidele antigenice sînt menținute pe suprafața celulei, prin legarea de unele molecule de suprafață, ca PBP72/74 (e) sau Ia (f) și sînt recunoscute de celulele T specifice (g), în asociere cu moleculele Ia (CMH). Legarea receptorului T de peptidele antigenice și de Ia transmite nucleului celulei T un semnal (h), care activează genele ce codifică factorii de creștere și de diferențiere, inclusiv pe cei ce stimulează celulele B (i), probabil prin legarea lor de receptori corespunzători pe suprafața celulelor B (j) (după Pierce și Margoliash, 1988).

Necesitatea prelucrării și „prezentării" antigenelor

Prelucrarea și „prezentarea" antigenelor asigură stimularea celulelor T_H și T_C, numai la suprafața celulelor receptoare specifice. Acest fenomen este necesar deoarece celulele T_H activate secretă factori de creștere și de diferențiere nespecifici pentru antigene (inclusiv pe cei necesari pentru a activa celulele B ca să secrete anticorpi), (Hamaoka și Ono, 1986). Ei stimulează *in vitro* toate celulele B, indiferent de prezența sau absența antigenelor. Or, aceste fenomene de activare policlonală și declanșarea unui răspuns imun nespecific al celulelor B trebuie evitat *in vivo*.

Datorită mecanismelor de prelucrare și „prezentare", cînd antigenul este limitat cantitativ, așa cum probabil se întîmplă *in vivo*, vor produce și prezenta o cantitate suficientă de peptide antigenice numai celulele B care au legat specific, au concentrat și internalizat o cantitate adecvată de antigen. În aceste condiții, celulele T_H specifice vor recunoaște numai peptidele legate pe suprafața celulelor B specifice și vor fi stimulate să producă factori de creștere și de diferențiere ai celulelor B. Acești factori, suficient de labili, vor fi secretați numai în vecinătatea celulelor

T activate sau vor fi transferați prin interacțiune directă T — B, pentru a se lega de receptorii corespunzători de pe suprafața celulelor B. Se realizează astfel un mecanism prin care sistemele celulare implicate utilizează o serie de factori nespecifici pentru a produce un răspuns foarte specific.

Un mecanism similar funcționează și în cazul celulelor T_C. Prelucrarea și „prezentarea" antigenelor în asociere cu moleculele de clasa I CMH asigură activarea lor și eliberarea granulațiilor citolitice numai la suprafața celulelor-țintă (spre exemplu, celule infectate cu virusuri), protejînd celulele normale.

Prelucrarea și „prezentarea" antigenelor de către celulele B au o semnificație deosebită în discriminarea self—nonself, proprietate fundamentală a răspunsului imun. Ea decurge din specificitatea de recunoaștere și legare a moleculelor de Ig, cu rol de receptor pe suprafața celulelor B și din extraordinara lor diversitate.

Eliberarea antigenelor

Macrofagele eliberează mici cantități de antigene în mediu, uneori perioade mai îndelungate de timp, independent de cele care persistă în interiorul sau pe suprafața lor. Antigenul eliberat în mediu este în formă macromoleculară, dar cu g.m. mai mică decît cel originar, ceea ce demonstrează că a fost supus în celulă unui proces de catabolism moderat. El are o imunogenitate foarte redusă în comparație cu cel care este „prezentat" legat de suprafața macrofagelor sau a celulelor dendritice (Sharma, 1986).

„Capturarea" limfocitelor în organele limfoide

Introducerea antigenelor în organism este urmată de modificări evidente în schimburile de celule dintre sînge și organele limfoide secundare. Limfocitele specifice antigenului respectiv dispar din sînge și se acumulează în organele limfoide, ca și cum un mecanism specific le-ar împiedica să le părăsească.

Utilizîndu-se limfocite marcate cu ^{51}Cr, s-a demonstrat prezența lor în splină, după inocularea intravenoasă sau intraperitoneală la șoareci singenici, stimulați cu un antigen. După introducerea subcutanată, sau după o grefă alogenică de piele, limfocitele sînt regăsite predominant în ganglionii limfatici. După 2 — 5 zile, schimbul este parțial restabilit: un număr mai mare de limfocite părăsesc organele limfoide și, în același timp, un număr corespunzător trec din sînge la nivelul lor. Mecanismul care împiedică reținerea lor nu mai este operativ. După ~ o săptămînă, numărul limfocitelor care părăsesc organele limfoide redevine normal, iar limfocitele activate de antigen se răspîndesc în tot organismul, prin intermediul sîngelui circulant (Moța, 1986).

„Capturarea" temporară a limfocitelor în organele limfoide secundare reprezintă, în mod evident, un mecanism adițional care favorizează întîlnirea dintre antigene și celulele efectoare ale răspunsului imun.

Fenomenele de recunoaştere şi receptorii

Această etapă, cu importanţă fundamentală în răspunsul imun, implică participarea a două fenomene asociate :

1) *Recunoaşterea structurilor proprii* datorită moleculelor de suprafaţă codificate de genele CMH, care reprezintă markerii de self ai organismului. Mecanisme extrem de complexe, incomplet elucidate determină o limitare riguroasă a răspunsului faţă de constituenţii proprii, împiedicînd autoagresiunea şi asigurînd toleranţa imunologică perfectă. Uneori, organismele pot forma anticorpi cu afinitate foarte slabă faţă de unii constituenţi proprii, ca, de exemplu, anticorpi faţă de ADN sau alte structuri celulare cu epitopi repetitivi. Niciodată însă, răspunsul normal nu va fi asemănător celui produs de respingerea grefelor sau de transfuziile sanguine incompatibile.

2) *Recunoaşterea substanţelor străine* (nonself) reprezintă alt fenomen esenţial, deoarece asigură specificitatea activării sistemului imunitar. Ea se realizează datorită receptorilor de pe suprafaţa celulelor T şi B capabili să recunoască şi să lege pe bază de complementaritate antigenele sau fragmentele imunogene rezultate din „prelucrarea" lor în macrofage. Marea diversitate a receptorilor T şi a Ig-receptor prezenţi pe celulele B permite organismului să răspundă, teoretic, la orice antigen posibil, indiferent dacă este natural sau sintetic.

Bazele moleculare ale fenomenelor de recunoaştere

Capacitatea de a recunoaşte diversitatea enormă de structuri moleculare prezente şi posibile în natură depinde de o vastă gamă de molecule naturale — *receptorii* — prezenţi la toate vertebratele pe suprafaţa celulelor sistemului imunitar. Fenomenul pare să fie cvasigeneral deoarece cele mai multe celule eucariote poartă în membrana celulară o varietate de molecule-receptor, care interacţionează cu diferite semnale extracelulare (antigene, hormoni, neurotransmiţători, medicamente etc.), pentru a iniţia un răspuns adecvat.

Studiaţi iniţial în special pentru interacţiile cu hormonii, receptorii au căpătat o importanţă deosebită după demonstrarea rolului lor în diferite funcţii imunitare (amorsarea proliferării şi diferenţierii celulelor B şi T de anumite antigene specifice, recunoaşterea celulă — celulă în cursul interacţiunilor celulare cooperante, fenomenul de „homing" al limfocitelor în teritorii specifice ale ţesutului limfoid etc. Odată cu aceasta a devenit evident că membranele celulare nu sînt simple containere, cu structură complicată pentru menţinerea constituenţilor celulari, ci structuri complexe, foarte dinamice, cu rol în recunoaşterea diferitelor semnale extracelulare şi în transmiterea informaţiei produsă pe această cale la organitele subcelulare.

Receptorii celulari

Sînt structuri chimice specifice, capabile să recepționeze anumite semnale din mediul ambiant și să le traducă într-un „limbaj" chimic perceptibil de diferitele structuri intracelulare, asigurînd transducția acestuia în celulă, pentru a declanșa un răspuns foarte selectiv (fig. 132).

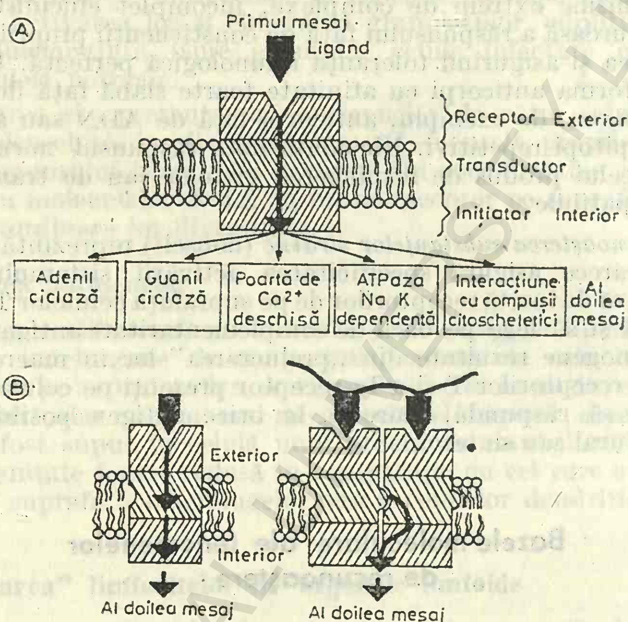


Fig. 132. — Reprezentare schematică a unui receptor de suprafață celulară și a funcțiilor principale. A. Recepția unui prim mesaj extern, transducția lui și inițierea unui mesaj secundar (intern). Acesta acționează printr-un număr limitat de mecanisme efectoare pentru a iniția răspunsul celular. B. Două modele de transducție a semnalelor externe prin receptorii membranari. Stînga : modificare conformațională directă a unui monomer, consecutivă legării ligandului. Dreapta : modificare conformațională în regiunile transductoare, indusă de agregarea receptorilor de membrană identici (după Greaves, 1975, modificat de Hood, 1984).

Cei mai mulți receptori sînt proteine integrate, care străbat membrana celulară și sînt formați din domenii distincte pentru recunoaștere, transducție și inițiere. Celulele diferențiate au seturi de receptori diferiți care le conferă un spectru propriu de a primi și răspunde la semnalele din mediu.

Principalii receptori de recunoaștere imunologică sînt : receptorii de antigene Ti de pe celulele T, imunoglobulinele de pe suprafața celulelor B, receptorii Fc pentru Ig, pentru componentul C3 al complementului, pentru lectinele mitogene, pentru hematiile unor specii, pentru lipopolizaharidele Gram-negative etc.

Prezența receptorilor poate fi identificată pe mai multe căi :

1) direct, prin tratarea lor cu anticorpi specifici, marcați fluorescent, sau cu izotopi radioactivi ;

2) prin extracție chimică ;

3) prin inhibarea activităţii lor *in vivo* sau *in vitro*, cu ajutorul serurilor antireceptor;

4) prin eliminarea selectivă a subpopulaţiei respective de limfocite.

Topografia receptorilor. Receptorii pot fi distribuiţi uniform pe toată suprafaţa membranei celulare (distribuţie continuă sau difuză) sau sub forma unor mici grupuri, separate de regiuni membranare lipsite complet de receptori *(distribuţie discontinuă)*. Densitatea lor (distanţa dintre doi receptori adiacenţi) poate varia chiar pentru acelaşi tip de celulă, în funcţie de faza ciclului celular şi/sau de influenţe externe.

Mobilitatea receptorilor poate fi demonstrată pe mai multe căi. Frye şi Edidin (1973) au urmărit soarta antigenelor de pe celulele umane şi murine, marcate cu coloranţi fluorescenţi diferiţi (fluoresceina-verde şi rhodamina-roşie), după fuziunea lor cu ajutorul virusului Sendaï. Imediat după fuziune, fiecare tip de antigen este limitat la jumătatea corespunzătoare a celulelor hibride, care au un aspect „bălţat" („harlequins"), pentru ca după o oră, la 37°C, să fie răspîndite pe toată suprafaţa celulei.

Mobilitatea Ig-receptor a fost demonstrată prin micrografii cu ajutorul anticorpilor anti-Ig fluorescenţi, după cum urmează:

1) Celulele marcate cu fragmentul Fab (monovalent, datorită clivării prealabile a anticorpilor cu papaină) sînt înconjurate de un inel continuu, difuz, colorat, corespunzînd distribuţiei normale a Ig-receptor în membrană. Deşi anticorpii anti-Ig sînt depuşi pe toată suprafaţa celulei, fluorescenţa este observată cel mai bine prin focalizare la periferia acesteia.

2) Marcarea cu anticorpi anti-Ig bivalenţi la temperatura de 4°C determină gruparea receptorilor sub forma unor „petice" („patches") sau „pachete" (Breischer, 1986) de receptori, printr-un proces pasiv, care nu necesită consum de energie.

3) Tratarea în acelaşi mod la 20–37°C determină o regrupare a peticelor la un pol al celulei pentru a forma o bonetă („cap") fluorescentă sau o „regrupare" (Bretscher, 1986) (fig. 133). Formarea „bonetei" este

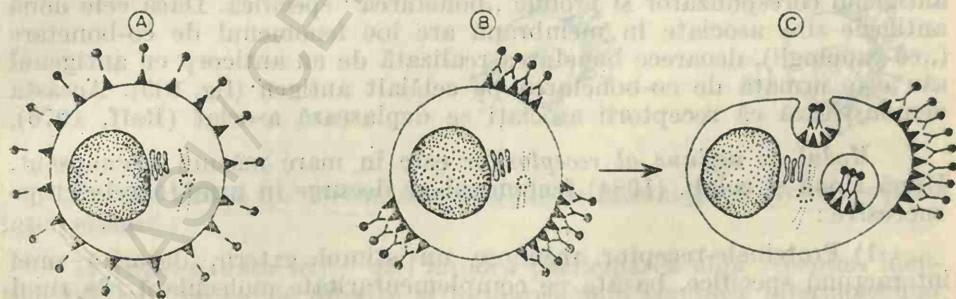


Fig. 133. — Rolul anticorpilor bivalenţi în inducţia distribuţiei antigenelor pe suprafaţa celulelor. **A.** Distribuţie normală evidenţiată prin marcare cu fragmente Fab monovalente. **B.** Anticorpii bivalenţi interconectează moleculele de antigen şi le grupează în „petice", chiar în celulele metabolic inactive. **C.** Dacă celulele cu „petice" sînt metabolic active, la temperaturi de 20–37°C, peticele se deplasează pentru a forma o „bonetă" polară, urmată de pinocitoza membranei marcate (după Raff, 1976).

un proces activ, care necesită energie și prezența unei concentrații adecvate de anticorpi (~ 80 000 molecule/celulă) și poate fi împiedicată prin tratare cu inhibitori metabolici.

4) După formare, boneta se poate desprinde în mediu („exfoliere") sau poate fi endocitată prin pinocitoză. Endocitoza începe după ~ 5 minute de la adăugarea anticorpilor fluorescenți și după o oră fluorocromul este integral intracelular.

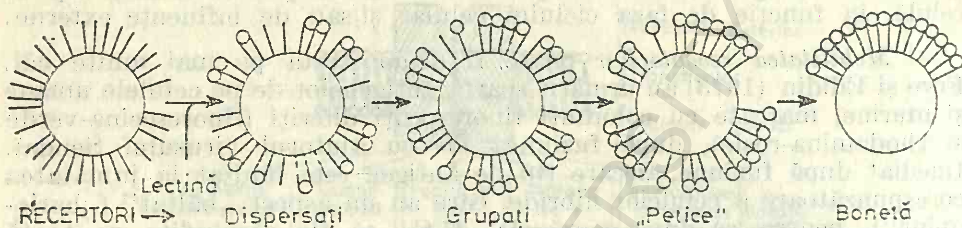


Fig. 134. — Receptorii de lectine sînt în mod normal răspîndiți aleatoriu pe suprafața celulelor normale sau transformate malign. Adăugarea unei lectine cu mai multe situsuri de legare interconectează receptorii, agregîndu-i inițial în grupuri, apoi, în „petice" mai mari și, final, într-o „bonetă" unică la un pol al celulei.

Mobilitatea și redistribuirea receptorilor este un fenomen cu caracter general și poate fi indus de liganzii corespunzători, care se leagă de receptori sau de antigene legate de membranele celulare. Fig. 134 prezintă acest fenomen pentru receptorii de lectine. O celulă care are mai multe tipuri de receptori poate reacționa simultan cu mai multe semnale din mediu, iar receptorii respectivi se deplasează independent, ca entități autonome. Studiul mobilității receptorilor și al antigenelor membranare permite cartarea suprafețelor celulare, respectiv stabilirea distribuției și relațiilor dintre antigene. Cînd două antigene A și B sînt separate pe suprafața celulei, anticorpii corespunzători anti-A și anti-B marcați cu fluorocromi colorați diferit (fluoresceină și rhodamină) se leagă specific, fiecare de antigenul corespunzător și produc „bonetarea" specifică. Dacă cele două antigene sînt asociate în membrană are loc fenomenul de co-bonetare („co-capping"), deoarece bonetarea realizată de un anticorp cu antigenul său este urmată de co-bonetarea pe celălalt antigen (fig. 135). Aceasta demonstrează că receptorii asociați se deplasează asociat (Raff, 1976).

Modul de acțiune al receptorilor este în mare măsură necunoscut. După Hood și colab. (1984) fenomenul ar decurge în următoarele etape succesive:

1) Proteinele-receptor recunosc un stimul extern, datorită unei interacțiuni specifice, bazate pe complementaritate moleculară (de tipul interacțiunii antigen — anticorp sau enzimă — substrat).

2) Transducția semnalului în interiorul celulei implică modificări ale domeniului corespunzător al receptorului, fie direct (în urma legării ligandului), fie indirect (prin apropierea receptorilor membranari identici, indusă de ligand).

3) Funcția de inițiere a reacțiilor intracelulare indusă de legarea receptorului de un stimul specific poate afecta în mod diferit mai multe tipuri de reacții efectoare, ca, de exemplu: a) mișcare sau imobilizare (prin acțiune directă asupra sistemului citoscheletului); b) deschiderea sau închiderea unei „porți" ionice specifice; c) activarea sau inactivarea unei pompe ionice; d) activarea producerii de AMPc sau GMPc, care, la rîndul lor, modulează activitățile proteinelor enzimatice sau de reglare etc.

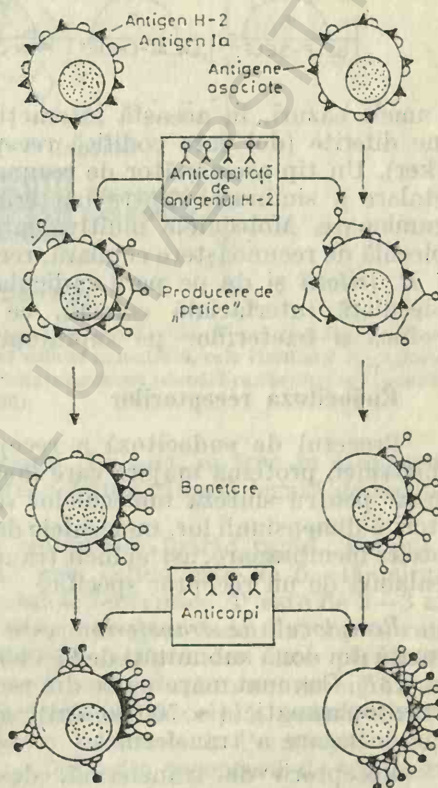


Fig. 135. — Reprezentare schematică a unei experiențe de „bonetare" și „co-bonetare" (după Götze și Bürger, 1986).

Practic există trei mecanisme posibile de interacțiune și recunoaștere intercelulare:

1) *Interacțiunea self — self* implică participarea unor receptori identici, prezenți pe celule diferite și formarea unui complex intermolecular cu simetrie binară. Un exemplu tipic este reprezentat de asocierea a două subunități dimere α și β ale hemoglobinei pentru a forma un tetramer $\alpha_2\beta_2$ (Hood și colab., 1984).

2) *Interacțiunea bazată pe complementaritate* se realizează între un receptor prezent pe o celulă care este recunoscut de o moleculă diferită

complementară de pe altă celulă (de exemplu, o glicoproteină de pe suprafaţa unei celule, recunoscută de o imunoglobulină de pe membrana limfocitului) (fig. 136).

3) *Interacţiunea bazată pe molecule-linker* permite legarea unor molecule de receptori de suprafaţă diferiţi prin interpunerea moleculelor-linker.



Fig. 136. — Reprezentare schematică a tipurilor de interacţiune specifică între receptorii de pe suprafaţa celulelor.

În unele cazuri, în această interacţiune pot fi implicaţi produşii a trei gene diferite (doi care codifică receptorii şi al treilea pentru molecula-linker). Un tip asemănător de recunoaştere acţionează în faza iniţială de instalare a simbiozei dintre bacteriile din genul *Rhizobium* şi plantele leguminoase. Moleculele multivalente de trifoliină A, lectină cu rol de moleculă de recunoaştere celulară, recunosc resturile glucidice de pe bacteria *R. trifolii* şi de pe perii radiculari ai plantei, determinînd structura moleculară interfacială corectă, ce iniţiază adsorbţia preferenţială şi specifică a bacteriilor pe suprafaţa rădăcinilor plantei.

Endocitoza receptorilor

Procesul de endocitoză a receptorilor a fost studiat cu ajutorul transferinei, proteina majoră care mediază înglobarea în celulă a fierului, necesar pentru sinteza moleculelor de hem, la nivelul măduvei oaselor. Datorită dimensiunii lor, moleculele de transferină nu pot traversa canalele proteice membranare, astfel încît transportul Fe este condiţionat de legarea prealabilă de un receptor specific.

Receptorul de transferină este o glicoproteină transmembranară, formată din două subunităţi de 95 000 dal, legate printr-o punte disulfidică (fig. 137). Cea mai mare parte din receptor este reprezentată de domeniul extracitoplasmatic (~ 70 000 dal). Fiecare subunitate poartă un singur situs de legare a transferinei.

Receptorii de transferină, descrişi iniţial pe suprafaţa celulelor eritroide umane (Jandl şi Katz, 1963), sînt prezenţi pe limfoblastele B, pe limfocitele normale stimulate să prolifereze de o lectină vegetală mitogenă şi pe mai multe celule tumorale umane. Ei fac parte din categoria receptorilor care introduc liganzi macromoleculari în celulă, prin mecanisme generale de endocitoză mediate de receptori (Bleil şi Bretscher, 1982). Legarea transferinei de receptori este urmată de depunerea unui strat de molecule de clatrină la nivelul lor, pe faţa internă a membranei celulare. Moleculele de clatrină formează prin alinierea lor o structură simetrică hexagonală, ca un fagure, pe faţa citoplasmatică a membranei. Pe măsură ce stratul de clatrină se îngroaşă, membrana celulară se invaginează, formînd o adîncitură ce se accentuează progresiv. Complexul receptor — transferină pătrunde în celulă, într-o veziculă membranară, care are pe

suprafaţa sa internă moleculele de transferină legate de receptori, iar pe faţa externă, moleculele de clatrină (Bretscher, 1985). Desprinderea ei de membrana celulară seamănă pe microelectronografii cu o picătură de apă ce cade de la un robinet. Cînd conţinutul veziculei devine mai acid (pH = 5,0), datorită acţiunii unei pompe protonice, ionii ferici se

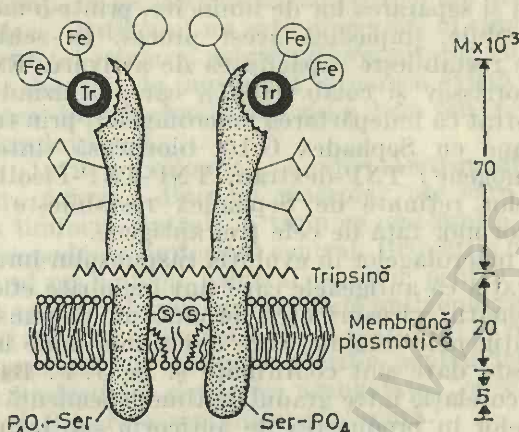


Fig. 137. — Model de structură a receptorului uman de transferină (Tr). Structurile romboidale marchează localizarea oligoglucidelor cu conţinut ridicat în manoză, cele circulare, oligoglucidele complexe, iar liniile fine în zigzag, acizii graşi legaţi covalent (după Trowbridge şi Shackelford 1986).

disociază şi sînt vehiculaţi spre lizosomi. De aici, ei trec în citoplasmă, în timp ce veziculele care conţin apotransferina rămasă legată de receptor sînt reciclate spre suprafaţa celulei.

Endocitoza prin receptori este un proces foarte rapid. Timpul de tranzit al receptorului de transferină prin celulă este de 5—15 minute. Cum timpul său de înjumătăţire în celulele leucemice T este de 2—3 zile, rezultă că în cursul existenţei sale fiecare receptor face mai multe runde de recirculare. Procesul de recirculare a receptorilor este permanent. În fiecare moment, o anumită proporţie din suprafaţa membranei formează invaginări care se detaşează de ea, pătrunzînd în celulă, pentru a reveni la suprafaţă printr-un mecanism selectiv necunoscut. Pe această cale, la fiecare 2—5 minute, sînt endocitaţi ~ 50% din receptorii de transferină (Trowbridge şi Strackelford, 1986). Se apreciază că macrofagele recirculă prin endocitoză la fiecare ~ 30 de minute echivalentul membranei lor celulare (Bretscher, 1985). Barnes şi Sato (1980) au demonstrat că transferina acţionează ca factor de creştere pentru toate celulele, fapt care explică prezumţia că exprimarea receptorilor săi este reglată coordonat cu creşterea celulară.

Endocitoza şi recircularea receptorilor asigură conservarea integrităţii diferitelor compartimente celulare şi refacerea ,,economică'' a membranelor celulare, deşi sînt expuse unor schimbări practic neîncetate (Trowbridge şi Shackelford, 1986). Sînt de asemenea procese cu importanţă fundamentală în secreţia sIgA şi sIgM la nivelul mucoaselor.

Interacțiunea macrofagelor cu limfocitele

Rolul esențial al macrofagelor în activarea limfocitelor a fost demonstrat inițial de Oppenheim și colab. (1968): îndepărtarea macrofagelor dintr-o suspensie celulară, bazată pe proprietatea lor de a adera de suprafețele de sticlă, ca și separarea lor de limfocite, printr-o membrană impermeabilă pentru celule, împiedică acest proces. În schimb, adăugarea celulelor aderente restabilește capacitatea de activare. Experiența a fost confirmată de Morrissey și colab. (1981), care, utilizînd o tehnică mai sigură, au demonstrat că îndepărtarea macrofagelor, prin trecerea celulelor splenice pe coloane cu Sephadex G 10, blochează sinteza anticorpilor față de trei imunogene: TNP-dextran, TNP-TNP-Ficoll și TNP-levan. Adăugarea celulelor reținute de Sephadex restabilește capacitatea de producere a anticorpilor față de cele trei antigene.

Importanța macrofagelor în evoluția răspunsului imun este demonstrată și de observația că antigenele care sînt înglobate eficient de macrofage (bacterii, hematii, virusuri etc.) produc un răspuns mai intens în anticorpi decît antigenele solubile, care devin mai bune imunogene după polimerizare. Aceste date sînt confirmate și de J. F. Bach (1976), care arată că există o corelație între gradul de timodependență al unui antigen și rolul macrofagelor în producerea de anticorpi sub influența lui. Antigenele sintetice sînt cu atît mai T-dependente cu cît sînt mai ușor degradate în macrofage. Cu toate acestea, rolul macrofagelor în anticorpogeneză este uneori controversat. După Ishevac (1984), răspunsul celulelor B la antigenele T-independente ar fi independent de macrofage, în timp ce Sharma (1986) consideră că, și în acest caz, macrofagele ar facilita răspunsul proliferativ al celulelor B, prin intermediul IL-1, produse de macrofagele activate.

Interacțiunea dintre macrofage și celulele T, realizată după imunizare în ganglionii limfatici, ar fi de două tipuri (Shevac, 1984):

1) *Interacțiunea precoce*, independentă de antigen, are o semnificație obscură: apropierea fizică dintre cele două tipuri de celule ar favoriza unele funcții trofice ale macrofagului și ar programa celulele pentru legarea ulterioară, dependentă de antigen, care duce la activarea celulelor T.

2) *Interacțiunea dependentă de antigen* este bazată pe compatibilitate CMH, respectiv pe prezența pe suprafața macrofagelor a moleculelor de clasa II CMH (Ia) pentru interacțiunea cu celulele T_H și a moleculelor de clasa I CMH pentru interacțiunea cu T_C (Benacerraf, 1981; Sharma, 1986).

Celulele T_H recunosc antigenele numai dacă sînt prezentate de macrofage în asociere cu moleculele Ia. Ele au o specificitate dublă, pentru antigenul străin și pentru moleculele Ia. Dovada o constituie faptul că celulele T provenite de la două linii pure de șoareci, care diferă numai prin natura moleculelor Ia, recunosc antigenul și răspund cu proliferare *in vitro* numai dacă antigenul este prezentat de macrofage singenice (aparținînd aceleiași linii celulare). Moleculele Ia apar pe suprafața macrofagelor tinere și numai pe un număr limitat de celule. Celulele

lipsite de molecule Ia sînt incapabile de cooperare cu celulele T. Procentul macrofagelor Ia^+ este mai mare în piele decît în pulmon sau peritoneu (Unanue, 1984). Menținerea macrofagelor Ia^+ în diferite țesuturi necesită recrutarea continuă de celule-stem și prezența unor stimuli adecvați.

Antigenele prelucrate în macrofage și cele depuse pe suprafața celulelor care prezintă antigenele, în general, persistă ca atare o perioadă mai lungă de timp, în localizările caracteristice ale acestora, în organele limfoide secundare. Antigenul nu este dispersat, ci concentrat în anumite regiuni ale suprafeței celulare, asigurînd prezentarea cu eficiență maximă. Fenomenul este deosebit de important, deoarece există o corelație directă între capacitatea proteinelor CMH de a lega un peptid imunogen și apariția răspunsului imun.

Werdelin (1979) a evidențiat pe microelectronografii existența unor grupări celulare formate dintr-un macrofag, de care se leagă, printr-o bază largă, un limfocit central, în timp ce mai multe limfocite periferice se leagă prin uropode de limfocitul central. Grupările celulare de acest fel se formează cînd un limfocit (central) specific pentru un anumit antigen vine în contact cu macrofagul, care prezintă antigenul respectiv. Limfocitul central este activat și sintetizează ADN. Legarea lui de macrofagul stimulat de antigen reprezintă un eveniment critic pentru inițierea răspunsului imun. Legarea limfocitelor periferice neangajate, „spectatoare” (de regulă celule T, dar și B), are o semnificație obscură.

În grupul de celule au loc două tipuri de interacțiuni: 1) *specifice*, între macrofag și limfocitul central, și 2) *nespecifice*, între limfocitul central și cele periferice, care se leagă temporar de el, pentru a se desprinde și a fi înlocuite de alte limfocite din mediu.

După Shevac (1984), formarea grupărilor celulare ar putea fi o reflectare fizică a fenomenului de recrutare și de amplificare a limfocitelor, mediat mai degrabă de contactele fizice dintre celule, decît de factorii solubili. *In vivo*, fenomenul ar putea avea semnificație în geneza centrilor germinativi.

Activarea limfocitelor

Activarea este un proces complex, determinat de interacțiunea limfocitelor cu un agent stimulator specific (imunogen) sau nespecific (mitogen), care le determină să treacă din stadiul de repaus (G0) în ciclul celular. Faptul că este un proces dinamic, cu evoluție în timp, a dus la presupunerea greșită că ar fi rezultatul unor evenimente ce se succed linear, după contactul limfocitelor cu agenții stimulatori, ceea ce reprezintă o suprasimplificare.

Activarea, consecință a diferitelor semnale produse la nivelul membranei celulare, este însoțită de modificări metabolice complexe (fig. 138), asociate cu proliferarea și diferențierea limfocitelor la subpopulații diferite, avînd anumiți markeri antigenici și receptori de suprafață, și o serie de funcții efectoare caracteristice. Ea evoluează ca un proces multistadial, cu multe mecanisme de reglare, care acționează asupra ciclului celular și asupra celulelor rezultate din diviziune, ce se pot matura la plasmocite

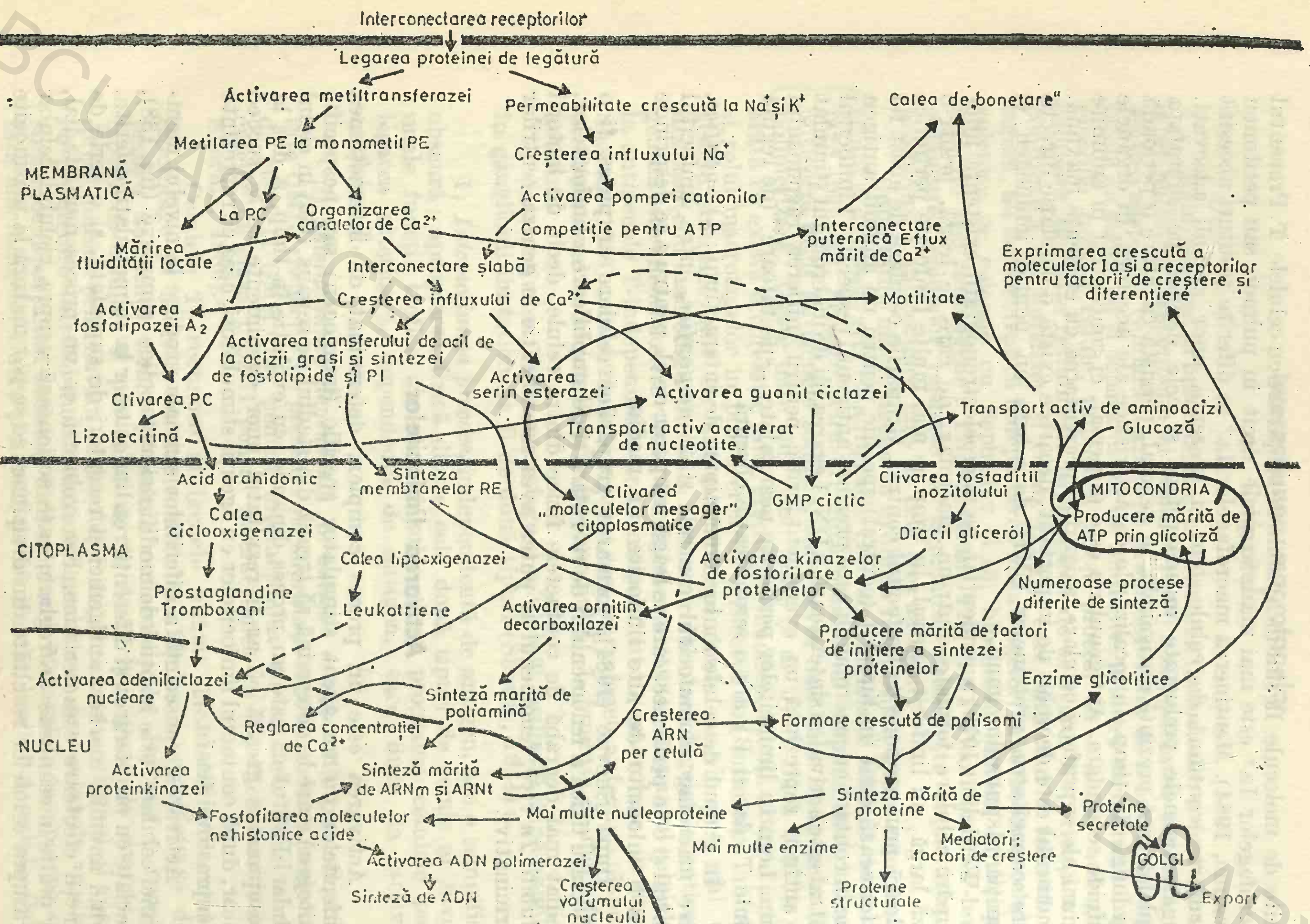


Fig. 138. — Reprezentare schematică a principalelor modificări biochimice asociate cu desfășurarea „programului de activare" a unui limfocit (după Paul și colab., 1984).

sau se pot reîntoarce la starea de repaus, pentru a reintra în ciclul de proliferare (Zola, 1985).

Procesul de proliferare asociat cu activarea are rolul important de a mări numărul celulelor capabile să reacționeze cu antigenul introdus în organism. În mod normal, numărul celulelor specifice pentru un singur determinant antigenic este foarte redus. Se apreciază că ar fi o celulă specifică la fiecare 50 000 de celule (Wigzell, 1984) sau o celulă la 100 000 (Stobo, 1984). De aceea, reactivitatea limfocitelor cu un antigen străin care ar conține, spre exemplu, 10 determinanți antigenici nu ar putea determina un răspuns imun eficient în absența unui mecanism de amplificare numerică și de activare funcțională. Amplificarea clonelor specifice de limfocite are două consecințe majore: 1) mărește numărul celulelor care se pot diferenția imediat la plasmocite și celule T efectoare; 2) furnizează un număr mare de celule asemănătoare precursorului originar, care asigură un răspuns mai prompt și mai intens la a doua întîlnire cu același antigen datorită memoriei imunologice.

Activarea cu ajutorul mitogenilor limfocitari

Studiul mecanismelor activării limfocitelor este foarte dificil, datorită în primul rînd numărului foarte mic al celulelor care leagă suficient de puternic antigenele pentru a iniția procesul de activare. Chiar în răspunsul imun secundar, după expansiunea clonală a celulelor specifice pentru antigen, numărul celulelor capabile să lege antigenele și să fie stimulate este mai mic de 1%.

Descoperirea mitogenilor limfocitari a permis înțelegerea unor funcții limfocitare și a unor interacțiuni legate de fenomenul esențial al activării acestor celule.

Mitogenii limfocitari (*lectinele*, *proteina* A din *Staphylococcus aureus* (SpA), *streptolizina* (SLL) din streptococii din grupul A etc.) sînt substanțe care stimulează nespecific un număr mare de limfocite, determinîndu-le să crească și să se dividă.

Lectinele. Lectinele (latin. „legere" = a alege, a selecta) sînt proteine neenzimatice, provenite din plante și animale, avînd afinități specifice de legare a oligoglucidelor din membranele celulare. Sînt produse normale, foarte răspîndite la plante, reprezentînd la soia și la *Canavalia ensiformis* 1—3% din constituenți. Au fost izolate inițial de la ricin (*Ricinus communis*), descrise ca fitohemaglutinine, datorită originii lor vegetale și capacității de a aglutina hematiile (Stillmark, 1986). Ulterior, s-a demonstrat că lectinele se leagă specific de suprafețele celulare, datorită prezenței pe suprafața lor a două sau mai multe adîncituri („clefts" ori „grooves") în care „se potrivesc" pe bază de complementaritate oligozaharidele membranare, în așa fel încît anumite grupări laterale din structura lor iau contact strîns cu mici regiuni de combinare adiționale (fig. 139). Datorită acestui mecanism, utilizînd o „baterie" de lectine, cu specificitate pentru oligozaharide diferite (deci cu suprafețe combinante diferite), se poate descifra compoziția suprafeței celulare (tabelul nr. 42). Cînd au

suprafețe combinante multiple, lectinele formează punți care interconectează un număr mare de celule, determinînd aglutinarea lor (fig. 140). Ele pot aglutina, în afară de limfocite, hematiile, bacteriile, microfungii, fibroblaștii, spermatozoizii etc. Localizarea lectinelor poate fi urmărită datorită posibilității de a le marca fie cu coloranți fluorescenți, fie cu iod radioactiv sau cu substanțe electronoopace (feritină).

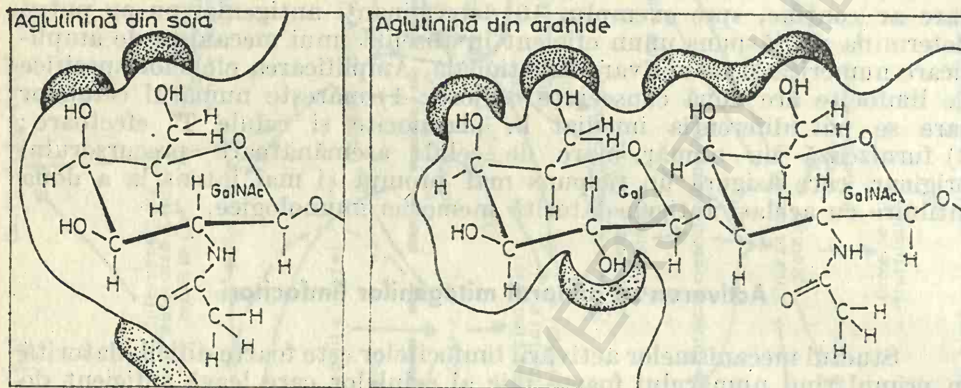


Fig. 139. — Reprezentare schematică a interacțiunii dintre situsul de legare a lectinelor cu grupările laterale ale anumitor glucide. Aglutinina din soia leagă acetilglucozamina sau galactoza, cea din arahide leagă ferm o combinație de galactoză și acetilglucozamină, sugerind existența unor situsuri de legare adiționale (punctat, dreapta sus) (după Raff, 1976).

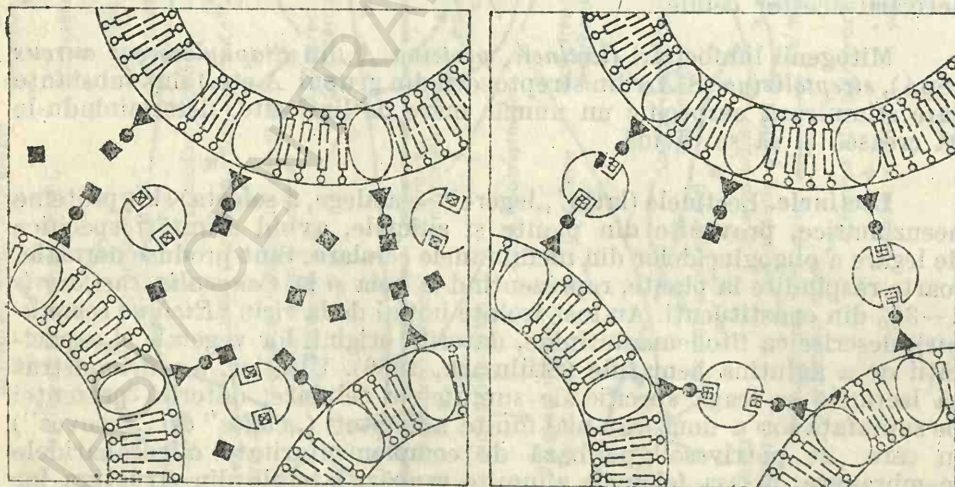


Fig. 140. — A. Aglutinarea celulelor consecutivă interconectării lor prin legarea lectinelor de receptorii specifici (unități ale unor catene oligozaharidice expuse pe suprafața celulelor) B. Aglutinarea este inhibată sau împiedicată dacă monozaharidul specific este adăugat suspensiei celulare. El ocupă preferențial situsul de legare al lectinei.

Tabelul nr. 42

Unele proprietăţi ale principalelor lectine utilizate în imunologie

Denumirea	Sursa	Greutatea moleculară ~ (dal)	Specificitatea pentru glucide*
Concanavalina A (ConA)	*Canavalia ensiformis* (jackbean)	51 000 (dimer)	α-D-Man α-D-Glc
Fitohemaglutinina (PHA)	*Phaseolus vulgaris*	140 000	D-GlcNAc
Leucoaglutinina	*Phaseolus vulgaris*	120 000	?
Lectina germenului de grîu	Germenii de *Triticum vulgare*	36 000	$(D\text{-}GlcNAc)_2$
Mitogenul din *Phytolacca* (Pokeweed-PMW)	*Phytolacca americana*	32 000	?
Lectina din soia (Soybean lectin)	*Glycine max*	120 000	D-GalNAc D-Gal
LCA (Lentil lectin)	*Lens culinaris* (*Lens esculenta*)	52 000	α-D-Man α-D-Glc
Lectina din ricin RCA[1]	*Ricinus communis* (*Castorbean*)	60 000 — 120 000	β-D-Gal
Lectina LP	*Limulus polyphemus*	400 000	Acid sialic
Lectina de *Helix pomatia*	*Helix pomatia* (Melcul de grădină)	79 000	D-GalNAc

* Cheia : D—Glc = D-glucoză ; D—Gal=D-galactoză ; D—Man=D-manoză ; GlcNAc= = N-acetil-D-glucozamină ; GalNAc = N-acetil-D-galactozamină.

Mecanismul de acţiune a lectinelor. Receptorii de lectine sînt răspîndiţi, difuz şi aleatoriu, pe suprafaţa celulelor normale sau transformate malign. Adăugarea unei lectine, cu mai multe situsuri de combinare, interconectează receptorii, agregîndu-i progresiv, pentru a forma grupuri („Clusters"), „petice" („patches") şi final „bonete" polare („Caps"), din care o mare parte se desprind de celulă („exfoliere") sau sînt endocitate. Formarea de „bonete" necesită consum de energie şi implică activitatea microfilamentelor contractile, care transmit semnalele de la membrana celulară la nucleu. Legarea lectinelor de membrana celulară şi gruparea receptorilor au un rol esenţial în producerea semnalului de activare.

Dovada a fost făcută de Nicolson şi Tae Ji (1974). Lucrînd cu membrane de eritrocite, ei au demonstrat că, în mod normal, moleculele vecine de *spectrină* (glicoproteină situată pe faţa citoplasmatică a membranei celulare) sînt situate la o distanţă de 1,1 nm, iar după legarea concanavalinei A (ConA) de receptorii săi, distanţa scade la 0,5 nm. Aceasta demonstrează că interconectarea receptorilor legaţi de lectine şi redistribuirea

lor pe suprafața celulei determină, datorită transmiterii transmembranare a stimulului, redistribuirea (agregarea) unei proteine situată pe suprafața internă a membranei. Spectrina, fiind în contact cu citoplasma și prin ea cu nucleul celulelor, ar putea influența mersul „mașinăriei" celulare și activarea.

Modificări morfofuncționale consecutive activării prin lectine. Celulele activate de lectine devin, după ~ 24 de ore, mai mari, prezintă o citoplasmă foarte bazofilă (datorită conținutului ridicat de ARN), bogată în poliribosomi, cu ergastoplasmă foarte dezvoltată și mitocondrii numeroase și dilatate *(transformare blastică)*.

Modificările biochimice apar cronologic în trei etape succesive:

1) *După cîteva secunde sau minute*: modificări în fluxul cationilor monovalenți (K^+, Na^+), activarea fosfolipazei A și transmetilarea lipidelor membranare, modificări în metabolismul fosfolipidelor, al acidului arachidonic și al prostaglandinelor, influxul de Ca^{2+}, activarea adenilat ciclazei și creșterea AMPc intracelular, fosforilarea proteinelor, activarea serinesterazei, creșterea transportului moleculelor mici prin membrană.

2) *După cîteva ore de la legare*: accelerarea sintezei proteinelor, a ARN și a poliaminelor, modificarea metabolismului glucidic.

3) *După cîteva zile*: odată cu inițierea sintezei de ADN, apariția mitozelor și a diviziunilor celulare. Efectul maxim asupra sintezei de ADN (măsurat în funcție de cantitatea de ^{3}H-Tdr (timidină tritiată) încorporată, apreciată prin autoradiografie sau spectrofotometrie cu scintilație), apare după 72 de ore.

Efectul lectinelor este variabil în funcție de cantitatea lor și de timp și este exprimat, de regulă, ca un indice de stimulare ce reflectă modificările semnificative față de comportamentul de bază al celulei. Lectinele se leagă de mai multe tipuri de celule, dar, în general, au o afinitate majoră caracteristică. De aceea, deși unele oligozaharide sînt răspîndite atît pe celulele T, cît și pe B, există lectine capabile de legare selectivă mai pronunțată pentru fiecare din cele două tipuri de celule (tabelul nr. 43).

Tabelul nr. 43

Specificitățile majore ale cîtorva mitogeni față de limfocitele umane

	Limfocite T	Limfocite B
Concanavalina A	++	+
Fitohemaglutinina	++	+
Leucoaglutinina	++	+
Proteina A (*S. aureus*)	+	++
Sulfatul de dextran	–	++

Rolul principal al lectinelor în natură ar fi de a apăra plantele de infecțiile produse de microfungi (care conțin chitină și polimeri de N-acetil-glucozamină în peretele celular), în special în fazele de umflare a semințelor, de germinare și curînd după însămînțare.

Activarea celulelor T

Se realizează pe două căi majore diferite: 1) prin intermediul receptorului complex de antigen Ti — T3 (receptorul T) și 2) pe calea alternativă, via receptorul T11.

Activarea prin intermediul receptorului T. Descifrarea structurii receptorului T a permis elaborarea unui model unificator de recunoaștere și activare a celulelor T. În acest proces, în funcție de natura subpopulației de celule T, structurile T4 și T8 servesc ca structuri auxiliare de legare, respectiv ca elemente stabilizatoare, ce facilitează contactul dintre celule necesar, în cazul celulelor T_H(T4$^+$), pentru amorsarea răspunsului imun, iar în cazul celulelor T_C(T8$^+$) pentru liza celulelor-țintă.

Meuer și colab. (1984) au semnalat existența unor celule cu receptori Ti — T3 cu mare afinitate pentru antigene, care se pot lega direct de acestea, fără nevoia participării structurilor T4 și T8 și chiar în contradicție cu regula de asociere a moleculelor T8, cu molecule de clasa I CMH, și a celor T4, cu molecule de clasa II CMH. Activarea mediată de receptorul Ti — T3 a fost studiată pe trei căi: 1) prin interacțiune cu celulele care prezintă antigenele (în special macrofage); 2) prin legarea anticorpilor monoclonali anti-Ti/T3, care simulează funcția antigenului, legîndu-se specific de complexul receptor de antigen; 3) cu ajutorul PHA sau al altor lectine mitogene (fig. 141).

Legarea antigenelor de receptorul T are o serie de urmări importante ca:

1) Apariția unor noi antigene de suprafață: a) după 4 ore, antigenul $4F_2$ cu funcție necunoscută; b) după 8 ore, receptorul de transferină (implicată în transportul Fe și în creșterea celulară); c) după 8—16 ore, receptorul de IL-2; d) după 24 de ore, receptorul de insulină.

2) Eliberarea de IL-2 endogenă printr-un mecanism endocrin și legarea ei de receptorii corespunzători, urmată de blastogeneză și de creșterea celulei T.

Rolul interleukinei-2. După Reinherz și colab. (1986), activarea și proliferarea celulelor T este determinată de IL-2 și apar în urma unei serii de evenimente perfect coordonate, evoluînd în următoarele faze succesive:

1) Celulele T în repaus exprimă pe suprafață un număr mare de receptori de antigen Ti/T3 și numai cîțiva receptori de IL-2 sau chiar nici unul.

2) Legarea antigenului de receptorii T și de produsul genei CMH este urmată de „modularea” (pierderea) receptorilor T.

3) Creșterea consecutivă a numărului receptorilor de IL-2 este urmată de o fază de sinteză și de secreție de IL-2, care se leagă de receptorii celulelor care au produs-o.

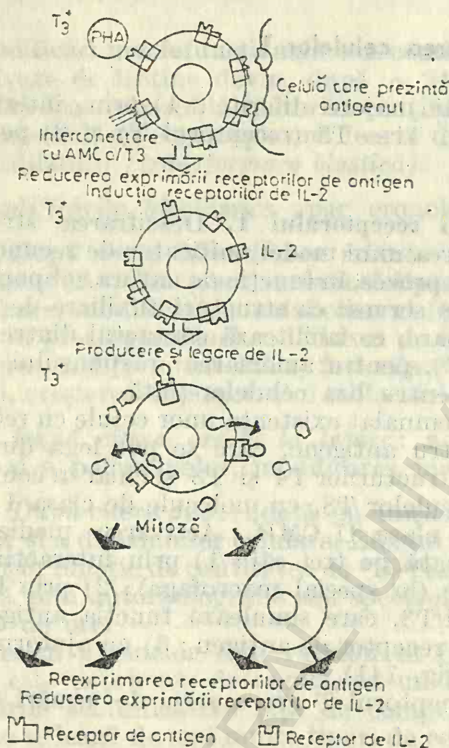


Fig. 141. — Activarea celulelor prin intermediul receptorului de antigen Ti/T3 poate fi indusă de celulele care prezintă antigenul, de interconectarea cu anticorpii monoclonali anti-T3 sau cu lectina mitogenă PHA (după Bolhuis și colab., 1986).

4) Legarea unei cantități suficiente de IL-2 amorsează sinteza de ADN și diviziunea celulară.

În absența stimulării antigenice are loc reapariția receptorilor de antigen T (Ti/T3) și respectiv reducerea numerică („modularea") receptorilor de IL-2. Exprimarea tranzitorie a receptorilor de IL-2 funcționează ca un mecanism de siguranță („fail-safe system"), care elimină riscul de proliferare necontrolată, printr-un mecanism dependent de IL-2. Se pare că nu toate celulele T produc IL-2, deși toate au receptorii respectivi. Proliferarea celulelor T poate fi amplificată și de IL-2 provenită din surse exogene.

Activarea mediată de moleculele de suprafață T11. Moleculele T11 prezente aproape pe toate celulele T ar fi echivalente moleculelor ancestrale din care au evoluat receptorii T. Ele apar foarte timpuriu în cursul dezvoltării timice (înainte de formarea receptorului de antigen Ti) și ar putea juca un rol important în stimularea celulelor T imature (Reinherz, 1985). Activarea pe această cale s-ar putea face independent de celulele care prezintă antigenele și de IL-1.

Calea T11 este reglată de complexul receptor Ti — T3. Ocuparea receptorului Ti de un antigen face celulele T refractare la activarea pe calea T11.

Recunoașterea asociată și restricția CMH

Spre deosebire de celulele B, limfocitele T, în general, nu leagă antigenele libere, ci recunosc numai antigenele legate de membrana celulară, în asociere cu produșii self ai genelor CMH. De aceea, procesul a fost numit de „recunoaștere dublă" („dual recognition") sau recunoaștere limitată de antigenele CMH („MHC restricted antigen recognition").

Fenomenul a fost demonstrat experimental de Zinkernagel și Doherty (1974, 1977), care au studiat capacitatea celulelor T_C de a recunoaște și distruge, *in vivo* și *in vitro*, celulele infectate cu virusul choriomeningitei limfocitare (VCML). În acest scop, au imunizat șoarecii din linia genetică pură K prin infectare cu doze subletale de VCML. După 6—8 zile, au testat efectul citotoxic al splenocitelor de la animalele infectate asupra unei suspensii de fibroblaști, proveniți de la un animal genetic identic, infectați cu același virus și marcați radioactiv. După incubare *in vitro* se constată omorîrea fibroblaștilor infectați, care poate fi evidențiată, atît microscopic, cît și prin eliberarea radioactivității din celulă.

Într-o altă serie de experiențe au utilizat fibroblaști neinfectați, precum și fibroblaști proveniți de la animale genetic identice sau genetic diferite (linia B), infectate cu același virus și cu un virus diferit (fig. 142).

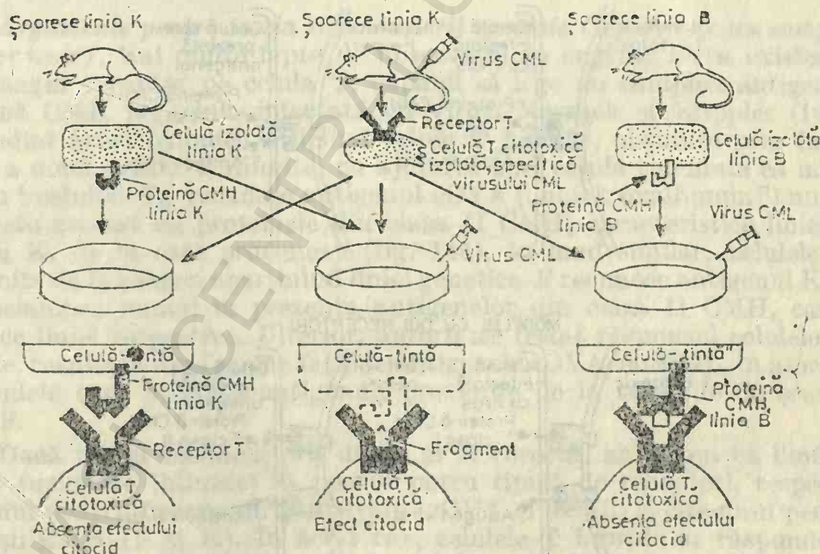


Fig. 142. — Reprezentare schematică a experienței lui Zinkernagel privind efectul timusului asupra celulelor T (după Marrack și Kappler, 1986).

Prin aceasta au demonstrat că efectul citotoxic al celulelor T_C se manifestă exclusiv asupra fibroblaștilor proveniți din aceeași linie genetică, infectați cu același virus.

Experiențele demonstrează că fenomenul de recunoaștere și activitatea celulelor T_C depind de doi factori : 1) prezența antigenului străin, viral, pe suprafața celulelor infectate ; 2) asocierea lui cu același marker propriu de self, prezent atît pe celulele infectate cu virus, cît și pe celulele T_C. Acest antigen propriu a fost identificat cu produsul genelor din clasa I CMH. Cînd celulele infectate cu virusuri poartă pe suprafață alt tip de molecule CMH clasa I, ca, de exemplu, în cazul fibroblaștilor proveniți de la animale care aparțin unei linii genetice diferite, recunoașterea nu are loc. În mod asemănător, limfocitele T_C provenite de la un animal infectat cu virusul A sînt inactive față de virusul B. Toate aceste date demonstrează necesitatea unei recunoașteri duble de către celulele T_C. Ele omoară celulele infectate cu virusuri numai dacă au același tip de antigene CMH ca și ele, deci dacă sînt compatibile. Fenomenul a fost numit *restricție CMH* pentru că limfocitele T_C sînt constrînse să interacționeze numai cu celule care poartă pe suprafața lor, pe lîngă antigenele străine, anumiți produși CMH pe care îi recunoaște.

Pentru a explica mecanismul acestui fenomen au fost formulate două ipoteze incompatibile :

1) *Teoria dublei recunoașteri* („Dual recognition theory") presupune că fiecare clasă de limfocite T are două tipuri de receptori, fizic separați, dar apropiați spațial, și anume unul pentru antigen, iar celălalt capabil să lege produsul genelor CMH (fig. 143).

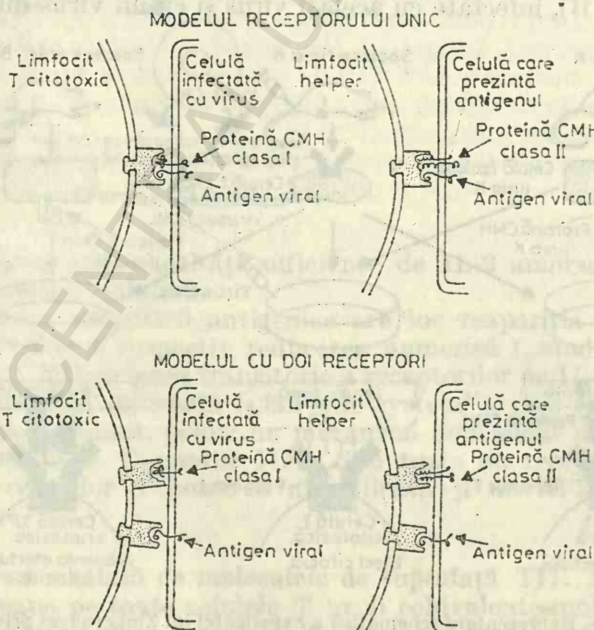


Fig. 143. — Receptorii de antigen ai celulelor T (spre deosebire de Ig) interacționează cu antigenele străine numai în prezența moleculelor CMH clasa I, în cazul celulelor T_C și clasa II în cel al celulelor T_H. Figura prezintă interacțiunile posibile cu o celulă infectată cu un virus, în cazul unui receptor unic (rezultat din asocierea moleculelor CMH cu antigenul viral) (sus) și în cel al unor receptori separați (jos) (după Tonegawa, 1985).

2) *Teoria recunoașterii asociate* („Associated recognition theory") consideră că limfocitele poartă un singur receptor, provenit din interacțiunea receptorilor de antigen (Ti/T3) cu proteinele self-CMH, prezente, de asemenea, pe suprafața lor. Limfocitele interacționează cu structura hibridă formată pe suprafața celulelor care prezintă antigenul prin asocierea determinanților antigenului exogen străin (viral sau tumoral) cu proteinele CMH ale acestora.

În ambele modele, celulele T_C interacționează, de fiecare dată, cu antigene străine exogene diferite și cu o formă invariantă de produs al genelor CMH, prezentă pe toate celulele unui animal.

Numeroase cercetări au demonstrat caracterul de generalitate al acestui fenomen, numit de Paul (1984) *co-recunoaștere* („Co-recognition"). El evoluează după următoarele norme generale:

1) Limfocitele $T3^+$ $T8^+$ citotoxice, T citolitice (T_C sau T_{CL}) și supresoare (T_S), precum și precursorii lor co-recunosc epitopii în asociere cu produșii genelor din clasa I CMH, prezenți virtual pe suprafața tuturor celulelor nucleate din organismele animale.

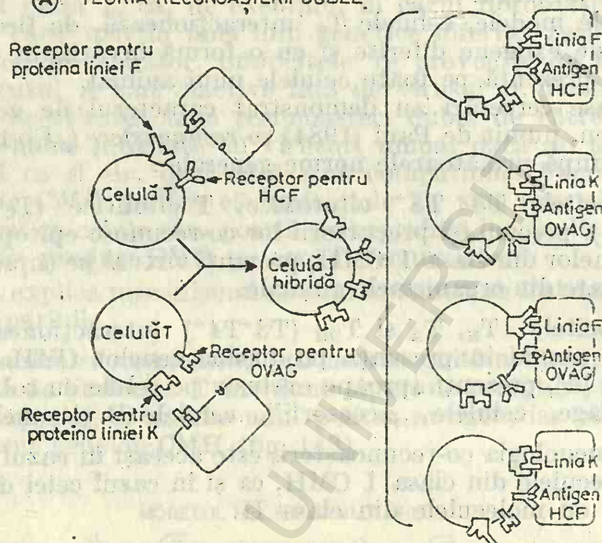
2) Limfocitele T_H, T_A și T_{DH} ($T3^+T4^+$) interacționează cu antigenele străine numai în prezența produșilor genelor CMH din clasa II (determinanții Ia), prezenți aproape exclusiv pe celule cu rol în răspunsul imun (macrofage, celulele „accesorii", celulele B și unele celule T).

3) Fenomenologia co-recunoașterii este aceeași în cazul interacțiunii T_C/T_S cu moleculele din clasa I CMH, ca și în cazul celei dintre celulele T_H, T_A și T_{DH} cu moleculele din clasa II.

Argumente pentru teoria recunoașterii asociate (legarea de un complex receptor unic). Mai multe fapte de observație au sugerat ideea existenței unui singur receptor pe celula T, capabil să lege un complex antigen — proteină CMH pe celula infectată cu virus. Marrack și Kappler (1986) au studiat acest fenomen utilizînd celule T hibride, obținute prin fuzionarea a două celule T diferite, cu ajutorul unei celule tumorale ca intermediar: celulele T_H recunosc antigenul cOVA („chick ovalbumin") numai cînd este asociat cu proteinele din clasa II CMH, caracteristice liniei de șoareci K, de la care proveneau (fig. 144). În mod similar, celulele T_H provenite de la șoareci aparținînd liniei genetice F recunosc antigenul KHL (hemocianina) numai în prezența antigenelor din clasa II CMH, caracteristice liniei respective. Ulterior, autorii au testat răspunsul celulelor T hibride, rezultate din fuziune față de antigenele cOVA și KHL, în asociere cu celulele care prezintă antigenul, provenite de la tulpinile de șoarece K și F.

Dacă teoria recunoașterii duble ar fi corectă, ar trebui ca limfocitele T fuzionate (hibride) să poarte patru tipuri de receptori, respectiv cîte unul pentru fiecare antigen străin (cOVA și KHL) și cîte unul pentru produșii CMH (F și K). În acest caz, celulele T hibride ar răspunde la ambele antigene prezentate atît de celulele F, cît și de celulele K. În realitate, celulele hibride răspund numai la antigenele la care răspundeau și celulele parentale: antigenele cOVA se asociază numai cu celulele tulpinii K, iar cele KLH numai cu cele ale tulpinii F. Aceasta demonstrează că limfocitele hibride se comportă în conformitate cu teoria recu-

noașterii asociate. Teoretic, mecanismul implică formarea unui complex prin interacțiunea antigenului străin și a proteinei CMH, înainte ca limfocitele T să se lege. Unanue și colab. (1985) au demonstrat experimental această posibilitate, deși ea are loc numai cu o eficiență foarte mică.



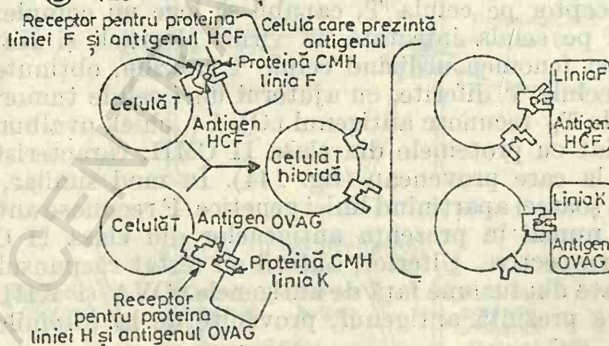


Fig. 144. — Reprezentare schematică a celor două teorii incompatibile privind recunoașterea de către celulele T a antigenului străin și a proteinelor codificate de CMH. A. Teoria recunoașterii duble. B. Teoria recunoașterii asociate (după Marrack și Kappler, 1986); HCF — hemocianină de la *Megathura*; OVAG — ovalbumină de găină.

Importanța deosebită a fenomenelor de recunoaștere și a restricției CMH a generat mai multe modele moleculare care încearcă să explice mecanismele prezentării antigenelor și interacțiunile care decurg între „celulele care prezintă antigenul" (CPA), celulele T, B și moleculele CMH.

Modelul complexului trimolecular. Heber-Katz şi colab. (1983) au propus un model în care antigenul şi moleculele Ia, codificate de CMH, formează, în prezenţa receptorului celulei T, un complex trimolecular stabil (fig. 145). Elementul esenţial este receptorul T, care poate lega

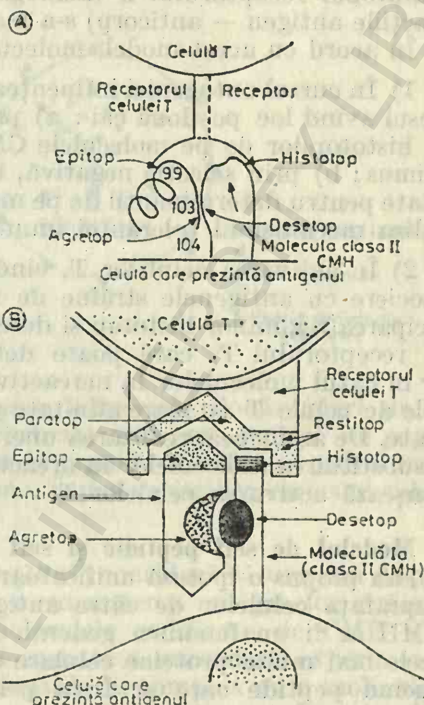


Fig. 145. — Recunoaşterea antigenelor de către celulele T. A. Model trimolecular de interacţiune a antigenului cu moleculele CMH de pe celulele care prezintă antigenul (CPA) şi receptorul T (după Paul, 1984). Antigenul este reprezentat de fragmentul 81 — 104 al citocromului c de la porumbel. Resturile 99 şi 103 — 104 sînt evidenţiate deoarece sînt părţi din epitop şi agretop. B. Prezentare de detaliu a diferitelor structuri implicate în recunoaşterea antigenului de către celulele T (modificat după Male, Champion şi Cooke, 1987).

atît antigenul, cît şi moleculele Ia, fie prin două situsuri separate de legare, fie într-un situs unic, rezultat din combinarea produşilor celor două elemente genetice, ca în cazul regiunilor variabile ale Ig („modelul recunoaşterii asociate"). Interacţiunile dintre antigen şi moleculele Ia implică participarea mai multor situsuri anterior nedefinite.

Pentru a ilustra constrîngerile impuse activării celulelor T de moleculele Ia, produse de genele Ir, modelul propune următorii termeni, care definesc situsurile potenţiale de interacţiune :

a) *Situsul agretop* (de la engl. „Antigen restriction element" + gr. „topos" = loc, situs) corespunde regiunii din antigen care vine în contact cu molecula Ia (clasa II CMH);

b) *Situsul desetop* (de la engl. „determinant selection") reprezintă porţiunea din molecula Ia corespunzătoare resturilor de aminoacizi care vin în contact intim cu antigenul (respectiv cu agretopul);

c) Resturile de pe molecula Ia care interacţionează cu receptorul T constituie al treilea situs denumit *histotop* (de la engl. „histocompatibility");

d) Porțiunea din receptorul T care vine în contact cu histotopul moleculei Ia reprezintă *restitopul* (de la engl. „Restriction site of interaction" sau *situsul de restricție*);

e) Pentru regiunea din molecula de antigen care interacționează cu paratopul receptorului T (analogă ca specificitate celei ce participă în reacțiile antigen — anticorp) s-a menținut termenul originar de *epitop*.

În acord cu acest model, moleculele Ia au două funcții:

1) În cursul ontogeniei influențează selecția repertoriului de celule T, procesul avînd loc pe două căi: a) prin selecție pozitivă, după recunoașterea histotopilor de pe moleculele CMH exprimate pe celulele epiteliale din timus; b) prin selecție negativă, în care clonele de celule T cu mare afinitate pentru determinanții de pe moleculele CMH sînt eliminate pentru a realiza mecanismul toleranței imunologice.

2) În activarea celulelor T, cînd moleculele Ia trebuie recunoscute în asociere cu antigenele străine de receptorul T. Evenimentul implică participarea regiunilor histotop și desetop. Rezultatul depinde și de afinitatea receptorului T, care poate determina activarea sau absența ei. Chiar în cazul moleculelor Ia nereactive sau slab reactive față de antigen, clonele de celule T cu mare afinitate pentru complexul antigen—Ia pot fi activate. De asemenea, realizarea unei interacțiuni antigen—Ia favorabile, prin substituirea moleculelor Ia areactive cu molecule reactive la antigen, declanșează activarea celulelor T.

Modelul de self peptidic și self imunologic. Kourilsky și Claverie (1986) au propus o ipoteză unificatoare, după care prezentarea peptidelor pe suprafața celulelor de către antigenele de clasele I și II codificate de CMH ar fi un fenomen general. În mod permanent, o mică parte sau cele mai multe proteine celulare sînt degradate în celulele somatice, producînd peptide care ar fi în permanență prezentate pe suprafața celulelor în care s-au format în asociere cu moleculele CMH. Ansamblul proteinelor expuse pe suprafața celulelor somatice, alcătuind un *self somatic*, este în permanență sub supraveghere imunologică (extinsă deci și la structurile intracelulare). Moleculele străine exogene, virusurile etc. nu fac excepție de la această regulă și sînt prelucrate ca oricare alte proteine. În celulele infectate cu virusuri sau transformate malign de o genă virală, peptidele derivate din proteinele virale competiționează cu cele derivate din proteinele celulare pentru a fi „prezentate" pe suprafața celulară (fig. 146). O proteină poate fi recunoscută ca „străină" dacă cel puțin un peptid derivat din ea nu face parte din ceea ce ipoteza consideră ca self somatic.

Considerînd mecanismele cunoscute de reglare a sistemelor imunitare, autorii postulează existența unui număr de peptide derivate din moleculele sistemului imunitar, care constituie un *self imunologic*, distinct de cel somatic. Presupunînd că peptidele derivate din unele molecule ca Ig, receptorii T, antigenele de clasele I și II CMH (care, după cum s-a demonstrat, sînt „internalizate" și degradate la peptide în celule) (Lanzavecchia, 1985) sînt prezentate pe suprafața celulelor sistemului imunitar, ele pot avea două apartenențe: 1) dacă nu au nici o funcție specifică, țin de self somatic; 2) dacă joacă un rol imunitar definit (de exemplu, în reglarea

răspunsului imun), aparțin moleculelor de self imunologic. În acest caz, ele trebuie să fie „străine" față de moleculele de self somatic (în accepțiunea ipotezei). Altfel, reglarea nu poate avea loc sau se poate produce o boală autoimună.

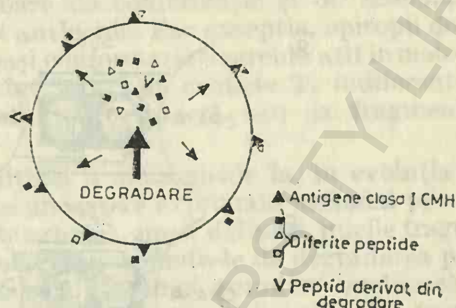


Fig. 146. — Prezentarea peptidelor pe suprafața celulelor somatice (după Kourilsky și Claverie, 1986).

Ipoteza stabilește distincții nete între cele două tipuri de self. Conceptul de self somatic implică existența unui set „închis" de peptide, în care variațiile sînt represate. Setul de peptide ce definesc cadrul de self imunitar este „deschis", în expansiune, expus variațiilor care sînt tolerate și chiar selecționate.

Ipoteza lui Werdelin. Werdelin (1987) consideră că una din dogmele centrale ale imunologiei moderne — recunoașterea antigenelor străine de celulele T numai în asociere cu moleculele codificate de CMH — este greșită, fiind rezultatul interpretării eronate a unor date experimentale. El nu contestă asocierea antigenului străin în complex cu o moleculă Ia, fapt demonstrat fără echivoc prin probe biochimice și funcționale, ci numai rolul celor doi componenți. Între altele, Werdelin citează, în sprijinul ipotezei sale, cazul clonelor de celule T cu specificitate dublă, a căror comportare nu poate fi explicată de nici una din variantele modelelor de recunoaștere propuse: „recunoaștere asociată", („Associative" sau „joint recognition"), „recunoaștere dublă" („Dual recognition") sau self alterat („Altered self") (Zinkernagel, 1987; Langman, 1978 ș.a.). Aceste celule răspund atît conform modelului de restricție CMH, reacționînd la o combinație între antigenul străin și o moleculă self de clasa II CMH și, în același timp, răspund la un determinant antigenic particular („private") al moleculelor Ia de pe suprafața celulelor străine (răspunsul de aloreactivitate, după modelul reacției limfocitare mixte). Or, după Werdelin, este greu de înțeles cum poate aceeași celulă să recunoască într-un caz un determinant combinatorial (antigen străin + determinant self Ia), iar în altul numai molecula Ia corespunzătoare haplotipului CMH al unei celule alogenice. El propune un model bazat pe premisa că limfocitele T recunosc numai determinanții antigenici străini, nu și moleculele Ia (clasa II CMH).

După acest model (fig. 147), antigenele timus-dependente sînt preluate de macrofage, care le prelucrează în lizosomi sau endosomi, prin degradare proteolitică menajată, după care sînt transportate la suprafața

celulei, pentru a fi „prezentate" celulelor T. Datorită prezenței unui situs de legare cu specificitate primitivă, moleculele Ia ar lega fragmentele de antigen rezultate, protejîndu-le de acțiunea enzimelor proteolitice din macrofag, transportîndu-le la suprafața membranei celulare.

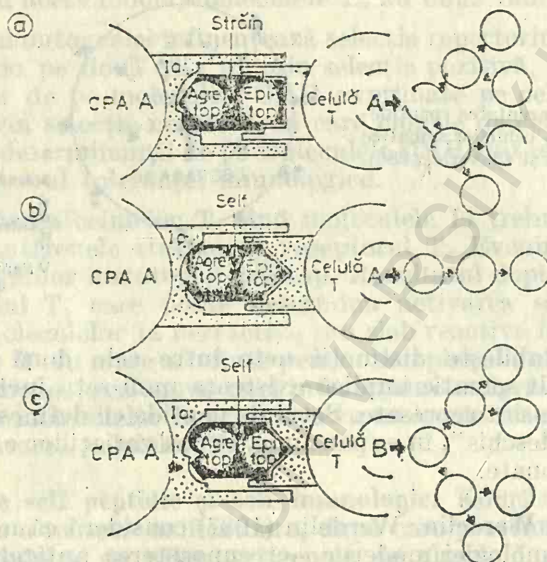


Fig. 147. — Modelul lui Werdelin (1987) privind recunoașterea antigenelor străine și a celulelor alogenice de către receptorul celulelor T.

Utilizînd nomenclatura propusă de Heber-Katz (1983), Werdelin consideră că agretopul fragmentului de antigen s-ar lega de molecula de Ia, „adăpostindu-se" în situsul de legare al acesteia. Determinantul antigenic străin (epitopul) „nud" ar fi astfel expus pe suprafața celulei, pentru a fi recunoscut de celulele T. Proteinazele din membrana celulară pot eventual să îndepărteze partea neprotejată a fragmentului de antigen care „bombează" din situsul de legare al moleculei Ia. Prin legarea agretopului de molecula Ia, fragmentul de antigen este menținut, un timp oarecare, într-o orientare și conformație stabilă pe suprafața celulelor care prezintă antigenele. Fragmentele de antigene care nu au un agretop adecvat nu se pot lega de moleculele Ia și sînt degradate complet în macrofage. Fragmentele de molecule self sînt tratate la fel ca și antigenele străine, respectiv se vor asocia prin intermediul agretopilor corespunzători de moleculele Ia, vor fi protejate de degradarea completă și vor fi transportate la suprafața celulelor care prezintă antigenele (CPA), unde epitopii self vor fi prezentați și recunoscuți ca atare de celulele T (fig. 147). În cazul aloreactivității, celulele T vor fi stimulate, nu de moleculele Ia alogenice, ci de epitopii de pe fragmentele de molecule.

În concluzie, după modelul lui Werdelin, celulele T recunosc numai epitopul unui antigen, care este menținut într-o poziție stabilă în membrana

celulară a unei CPA de către o moleculă Ia, legată de agretopul fragmentului de antigen respectiv. În măsura în care celulele T nu recunosc decît epitopul unui antigen, modelul nu explică de ce celulele T nu recunosc antigenele străine timodependente și în stare nativă, liberă, solubilă. După Werdelin (1987), epitopii celor mai multe antigene nu există ca atare în molecula intactă a acestora. Excizia fragmentului de antigen din molecula nativă este însoțită de o schimbare de conformație și de sarcină, care asigură caracterul de determinant antigenic. Fac excepție, epitopii de tipul grupărilor haptenice, care au aceeași conformație și sarcină atît în moleculele native, cît și după excizie. Ei sînt legați de celulele T, indiferent dacă sînt prezenți pe o moleculă purtătoare intactă sau ca fragmente pe suprafața CPA.

Modelul implică apariția inițială a moleculelor Ia, în evoluția sistemului imunitar, ca molecule de recunoaștere exprimate neclonal pe macrofage. Ele ar lega cu o specificitate arhaică, prost definită, micile fragmente din proteinele înglobate de macrofage, protejîndu-le de degradarea proteolitică. Odată cu apariția celulelor T, sistemul primitiv evoluează spre recunoașterea epitopilor de pe fragmentele de antigene, pe calea unui larg repertoriu de receptori sofisticați, distribuiți clonal. Deoarece moleculele Ia determină care epitopi ai unei anumite proteine trebuie prezentați, repertoriul de specificități al celulelor T intră sub controlul genelor Ir ale fiecărui individ. În ambele sisteme, moleculele Ia au rolul de a proteja epitopii antigenelor proteice de degradarea proteolitică și de a-i prezenta într-o formă stabilă, pentru a genera un răspuns imun mai intens și mai precis (Werdelin, 1987).

Modelul lui Poljak. Bazat pe asemănarea dintre organizarea situsului de combinare al anticorpilor și cea a heterodimerului care formează receptorul T, Poljak (1987) consideră că structura tridimensională și baza moleculară a legării antigenelor de receptorul T ar fi asemănătoare celor întîlnite în reacția antigen — anticorp. El propune un model molecular în care receptorul T recunoaște simultan antigenele străine și moleculele CMH, prin intermediul unui situs de combinare asemănător celui al Ig. Modelul este derivat din structura tridimensională a determinantului antigenic al lizozimului, care interacționează cu anticorpul monoclonal specific D1.3. Relația a fost studiată de Poljak împreună cu Amit și colab. (1986) cu scopul explicării interacțiunii antigen — anticorp la nivel molecular.

În acest model (fig. 148), determinantul format de antigenul străin și complexul Ia (moleculă de clasa II CMH) este recunoscut de un singur situs de legare al receptorului T, avînd o suprafață de ~ 25 × 30 Å. Din cei 16 aminoacizi ai antigenului care vin în contact cu situsul de legare al anticorpului, cei marcați cu litere de la *a* la *h* aparțin antigenului străin. Ei corespund secvenței următoare din molecula de lizozim : Lys 116 (a), Gly 117 (b), Thr 118 (c), Asp 119 (d), Val 120 (e), Gln 121 (f), Ile 124 (g) și Leu 129 (h). Resturile aminoacizilor marcați cu cifre de la 1 la 8, care corespund secvenței Asp 18 — Asn 27 din structura lizozimului, ar fi conectate de catenele ușoare și grele ale anticorpului specific D1.3. În acest model, ele ar corespunde resturilor expuse ale moleculei Ia, contactate de catenele α și β ale receptorului de antigen. Agretopul,

particularitate structurală a antigenului prelucrat, necesar pentru legarea moleculelor Ia (Schwartz, 1985), poate fi plasat fie imediat alături, fie în mijlocul determinantului antigenic recunoscut de receptorul T. Acest agretop ar putea fi reprezentat de aminoacizii intercalați 122, 123, 125, 126, 127, 128, precum și de alții, ce preced Lys 116 sau urmează Leu 129, care nu vin în contact cu „receptorul de antigen"' dar ar putea fi utili în interacțiunea cu structura subiacentă, reprezentată de o moleculă CMH Ia.

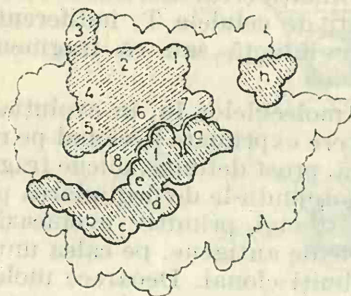


Fig. 148. — Modelul structural al lui Poljak (1987) privind interacțiunea dintre un determinant antigenic reprezentat de un complex antigen străin — molecula Ia și paratopul unui receptor (în acest caz situsul de combinare al anticorpului monoclonal D.13).

Modelul presupune că interacțiunea cu complexul Ia/antigen străin este limitată la situsul de combinare al receptorului T, format prin regiunile determinante de complementaritate și la resturile de aminoacizi adiacenți. El nu implică necesitatea unor modificări conformaționale și poate fi adaptat la diferite combinații de antigene străine și molecule CMH.

În ultimii ani a fost acordată o atenție deosebită interacțiunilor posibile între substanțele nonself și antigenele CMH. Unanue și Grey (1985) consideră că fragmentele de antigene prezentate de macrofage se leagă direct de proteinele CMH. După Getter (1986), proteinele CMH s-ar comporta ca un receptor de suprafață celulară, dotat cu un situs de legare pentru diferitele peptide antigenice. Or, ipoteza legării unor antigene diferite de același receptor contravine conceptelor biologiei moleculare : un receptor leagă o singură substanță sau cel mult un număr limitat de molecule înrudite structural. Ceva mai mult, dat fiind numărul enorm de antigene potențiale, în raport cu cel al proteinelor CMH, mecanismul ar fi inoperant, chiar dacă acestea ar avea mai multe situsuri de legare. Într-o încercare de a explica legarea diferitelor peptide imunogene de o singură moleculă CMH, ca și activarea celulelor T_{H} cu specificitate unică pentru un anumit antigen, Unanue și Getter (1987) consideră că peptidele imunogene au secvențe de aminoacizi care formează, în același timp, contacte cu proteinele CMH și cu receptorii de antigen ai celulelor T_{H} sau T_{C}. Deși proteinele din care provin sînt foarte diferite, peptidele imunogene prelucrate și „prezentate" de macrofage, prin intermediul aceleeași molecule CMH, ar avea două tipuri de secvențe : 1) unele secvențe de aminoacizi, identice sau numai asemănătoare, care nu sînt situate obligatoriu adiacent în secvența lineară a peptidului ar forma contacte cu proteinele CMH ; 2) alte secvențe, foarte variabile, care determină caracterul nonself al acestora, ar fi recunoscute ca atare de celulele T_{H} sau T_{C} specifice pentru antigenul corespunzător. Alte modele (Matzinger, 1981 ; Patten

şi colab., 1984 ; Schwartz, 1985) acordă un rol esenţial modificărilor conformaţionale, fie ale peptidului imunogen, fie ale proteinei CMH, ca o particularitate-cheie a recunoaşterii asociate a antigenului străin şi a proteinei CMH de către receptorul T.

Recent, Marrack şi Kappler (1987), într-o încercare de sinteză, au propus trei mecanisme potenţiale, cu caracter general, pentru recunoaşterea antigenelor de către celulele T (fig. 149), bazate pe următoarele premise, în parte demonstrate experimental :

1) Orice proteină străină, ca, de exemplu, ovalbumina, este degradată ca o precondiţie a recunoaşterii şi activării, în mai multe fragmente peptidice diferite de către enzimele proteolitice intracelulare. În cele mai multe cazuri, cel puţin unul din aceste peptide este capabil să se lege de una din moleculele codificate de CMH, prezente pe suprafaţa celulelor T (Babbitt, Unanue şi colab., 1985).

2) Moleculele CMH sînt capabile să lege peptidele selecţionate. Ele fac acest lucru cu un grad înalt de promiscuitate prin faptul că un singur tip de molecule CMH poate lega o mare varietate de peptide diferite.

3) Pentru ca o anumită proteină să stimuleze celulele T ale unui organism, ea trebuie să producă, prin clivare, peptide capabile să se lege de moleculele CMH prezente pe celulele organismului respectiv, iar celulele T să poarte receptori capabili să recunoască complexul antigen peptidic-moleculă CMH.

Fig. 149 A prezintă schematic concepţia admisă curent privind recunoaşterea unui antigen peptidic străin, asociat cu moleculele CMH de clasa II, de pe suprafaţa celulelor care prezintă antigenul. Receptorul celulelor T se leagă de complexul format prin asocierea peptidului străin cu catenele α şi β codificate de CMH. Fig. 149 B prezintă cazul unui procent ridicat dintre receptorii T, care sînt capabili să recunoască moleculele CMH străine (alogenice) ca atare, în absenţa unui peptid. În sfîrşit, fig. 149 C prezintă o variantă în care moleculele CMH alogenice

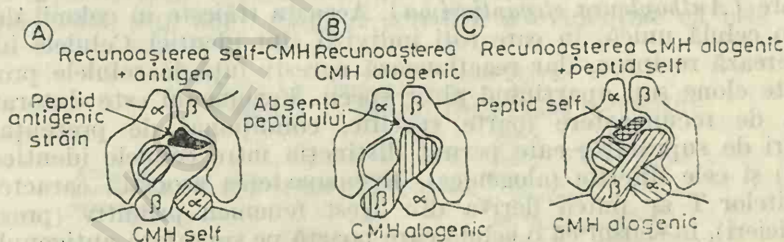


Fig. 149. — Reprezentare schematică a mecanismelor potenţiale, cu caracter general, de recunoaştere a antigenelor de către celulele T (după Marrack şi Kappler, 1987).

trebuie să fie întotdeauna legate de un peptid. În absenţa unui peptid străin, funcţia acestuia este preluată de un peptid rezultat din catabolismul normal al proteinelor self endogene, în cursul procesului de turnover normal. În felul acesta, receptorul T recunoaşte o moleculă CMH alogenică asociată cu un peptid self.

Semnificația recunoașterii asociate și a restricției CMH

Faptul că interacțiunile celulare din cursul răspunsului imun sînt, în general, dependente nu numai de prezența antigenului străin corespunzător, ci și de produșii genelor CMH a stimulat numeroase cercetări pentru explicarea acestui fenomen neobișnuit. Caracterul său de generalitate a dus la ipoteza că limfocitele T au adoptat acest sistem, în cursul evoluției, deoarece oferă un anumit avantaj evolutiv. Două ipoteze încearcă să explice această comportare :

1) Recunoașterea asociată ar favoriza limfocitele T citotoxice (citolitice) în acțiunea lor de distrugere a unor celule-țintă infectate cu virusuri sau cu modificări ale antigenelor de suprafață. Dacă celulele T_C ar recunoaște și interacționa numai cu virusul liber în circulație, acesta ar fi eliminat, dar celulele infectate ar continua să producă mii de virioni, capabili să infecteze alte celule și să se disemineze în organism. Cînd celulele T_C recunosc antigenul viral numai asociat cu o moleculă self CMH, care marchează celulele-gazdă infectate, ele distrug numai aceste celule, apărîndu-le pe cele sănătoase de infecția virală și, în același timp, de distrugere. Prin acest mecanism, efectul citotoxic (citolitic) este focalizat exclusiv asupra celulelor infectate. Apărarea antivirală este favorizată și de faptul că limfocitele T_C recunosc antigenele virale de pe suprafața celulelor în asociere cu moleculele din clasa CMH, care sînt prezente practic pe toate celulele animale susceptibile la infecțiile cu virusuri. În felul acesta, celulele T_C asigură supravegherea întregului organism, eliminînd toate celulele care poartă antigene virale sau anormale de suprafață și evitînd interacțiunile neadecvate cu antigenele libere.

2) După o altă ipoteză, recunoașterea asociată și restricția CMH ar reflecta posibilitatea derivării sistemului imunitar actual din sistemele de discriminare primitivă între indivizi din aceeași specie sau din specii diferite, prezente la animalele lipsite de sistem imunitar. În sprijinul acestei ipoteze, Truffa-Bachi și Leclerc (1985) citează cazul anemonei de mare *(Anthopleura elegantissima)*. Aceasta trăiește în colonii derivate dintr-o celulă unică, în care toți indivizii sînt identici. Celulele identice se tolerează reciproc, dar reacționează agresiv față de celulele provenite din alte clone sau aparținînd altor specii. Fenomenul este datorat unui sistem de recunoaștere foarte specific, condiționat de prezența unor markeri de suprafață, care permit distincția între celulele identice (singenice) și cele diferite (alogenice). Recunoașterea asociată caracteristică limfocitelor T ar putea deriva din acest fenomen primitiv (prezent și la tunicieri), în sensul că o celulă care poartă pe suprafață antigenul CMH clasa I asociat cu un antigen viral sau tumoral poate fi asimilată unei celule străine și în consecință este atacată și distrusă. În cazul celulelor T_H, care nu recunosc antigenele străine decît dacă sînt asociate cu moleculele CMH din clasa II (prezente numai pe un număr limitat de celule), recunoașterea asociată ar evita producerea unui răspuns imun dirijat față de self.

Recunoașterea asociată a antigenului străin și a produșilor CMH funcționează ca un sistem de siguranță cu două chei, care, pe de o parte,

asigură eficiența răspunsului imun și, pe de alta, limitează potențial distructiv al limfocitelor:

1) Dacă celulele T_C ar recunoaște antigenele străine libere, ar putea neutraliza (deși ineficient, datorită caracterului aleatoriu al întîlnirii lor), spre exemplu, virusurile libere în sînge, fără a putea limita replicarea lor foarte activă și diseminarea din celulele infectate la alte celule sănătoase.

2) Dacă celulele T_C ar fi activate numai de proteinele gazdei, ar avea o putere de distrugere a celulelor sănătoase ale organismului incompatibilă cu o fiziologie normală a acestuia.

Activarea celulelor B

Activarea celulelor B este un proces multistadial, care implică declanșarea unui ciclu proliferativ, urmat de diferențierea și maturarea la stadiul de plasmocit producător de anticorpi. Inducția stimulării de către un antigen este un fenomen specific, în timp ce stadiile ulterioare sînt imunologic nespecifice. Au fost descrise două căi majore de activare a celulelor B: 1) activarea dependentă de celulele T și 2) activarea independentă de celulele T.

Activarea celulelor B dependentă de celulele T

Cele mai multe antigene, denumite timodependente (TD), au nevoie de „ajutorul" celulelor T pentru a iniția sinteza de anticorpi, spre deosebire de antigenele TI (timoindependente), care pot produce acest fenomen fără necesitatea cooperării T — B. Deși mecanismele intime ale cooperării T — B sînt încă insuficient cunoscute au fost descrise două tipuri principale de activare: 1) activarea dependentă de factori solubili, specifici și nespecifici, și 2) activarea dependentă de contactul direct T — B, supusă restricției CMH (fig. 150). Studiul activării a evidențiat că cele două

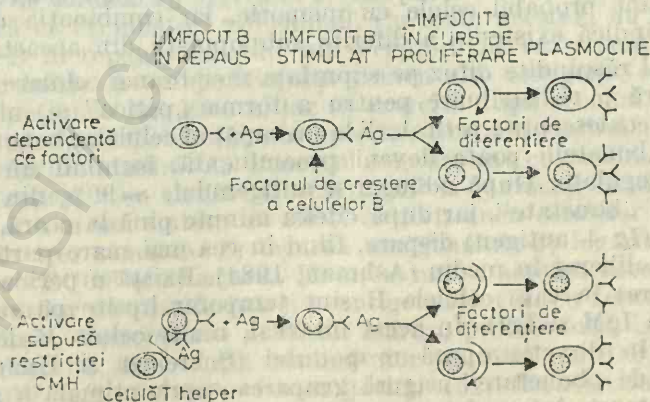


Fig. 150. — Reprezentare schematică a activării dependentă de factori și supusă restricției CMH a limfocitelor B (după Paul, 1984).

tipuri de activare sînt întîlnite la subpopulații funcțional și fenotipic diferite, prezente la șoarece în număr aproximativ egal. Ele diferă în special prin: 1) natura antigenelor exprimate pe suprafață; 2) particularitățile imunogenilor la care răspund și 3) natura mecanismelor de reglare care le controlează.

Necesitatea cooperării T_H — B în cursul răspunsului imun, indus de antigenele T dependente, a fost evidențiată de o serie de observații:

1) răspunsul în anticorpi față de majoritatea antigenelor este considerabil diminuat după timectomie neonatală și restabilit după transplant de timus sau de celule timice;

2) capacitatea șoarecilor iradiați de a produce anticorpi față de hematiile de berbec este restabilită numai prin transplantul asociat de celule B (medulare) și T (timice). Separat, cele două tipuri de celule sînt ineficiente;

3) concentrația anticorpilor produși este influențată de raportul dintre celulele T și B. Această particularitate a fost demonstrată prin restabilirea imunocompetenței șoarecilor iradiați letal cu un amestec de celule provenite din măduvă și timus, în *doze variate*.

Imunizarea cu albumină serică bovină este urmată de producerea de anticorpi după ~ o lună. La doze constante de celule din timus, concentrația anticorpilor scade paralel cu scăderea dozei de celule cu origine medulară. Pentru o doză constantă de celule medulare, concentrația anticorpilor scade paralel cu diminuarea numărului de celule timice.

Receptorii de antigen ai celulelor B. Limfocitele B imunocompetente virgine poartă pe suprafață receptori specifici de antigen, sub forma unor molecule de IgM și IgD, legate de membrana celulară. Ele au o specificitate unică și corespund tipului de anticorp pe care îl vor sintetiza plasmocitele rezultate din proliferarea și diferențierea clonei respective de celule B. Au fost evidențiate, de asemenea, celule triplu izotipice, care exprimă IgM, IgD și IgA sau IgG, precum și celule care poartă numai IgA sau IgG. După Zola (1985), celulele care poartă alte izotipuri, diferite de IgM sau IgD, sînt probabil celule cu memorie, iar combinația de izotipuri exprimate indică existența a diferite subpopulații din această categorie.

Inițial răspîndite difuz pe suprafața membranei celulare, moleculele de Ig suferă o redistribuire pentru a forma „petice" și, ulterior, prin migrarea și coalescența „peticelor" la un capăt al celulei, „bonete" („cap"). Regiunea „bonetei" poate deveni proeminentă, formînd un uropod cu margini neregulate. După adăugarea antigenului, ~99% din moleculele de Ig pot fi „bonetate", iar după cîteva minute pînă la o oră, materialul din bonete (Ig + antigen) dispare, fiind în cea mai mare parte endocitat sau parțial eliberat în mediu (Ashman, 1984). Există o perioadă de timp (~24 de ore) în care celulele B sînt temporar lipsite pe suprafață de molecule de IgM și IgD. În acest interval, multe celule B devin mobile și alunecă în direcție opusă uropodului (Schreiner și Unanue, 1976). Fenomenul de „bonetare" asigură gruparea supraoptimală a moleculelor de Ig-receptoare într-o formă care permite reacția cu o concentrație adecvată de antigen.

Activarea celulelor B dependentă de factori. Acest tip de activare este limitat, după Paul (1984), la celulele Lyb-5$^+$, care au ca marker principal aloantigenul Lyb-5 prezent în stadiile tardive de maturare ale celulelor B. Este absentă la șoarecele nou-născut și la șoarecii din linia „xid" (cu imunodeficiență legată de cromosomul X). Blocarea antigenului Lyb-5 cu anticorpii monoclonali specifici determină deficite funcționale majore ale celulelor purtătoare.

Celulele Lyb-5$^+$ pot fi induse să prolifereze de orice ligand care interacționează cu receptorii IgM de pe suprafața lor ca, de exemplu, de activatorii policlonali ai celulelor B, de anticorpii anti-Ig, de unii compuși neimunoglobulinici (ca virusul Epstein-Barr, *Chlamidia trachomatis*, polizaharidele solubile, endotoxine, lipopolizaharidele bacteriilor Gram-negative), precum și de unele antigene T-dependente. Existența acestui mecanism a fost demonstrată *in vitro* prin cultivarea celulelor T_H sensibilizate la antigene, separate de celulele B, prin membrane permeabile pentru proteine și impermeabile pentru celule. Efectul specific pentru antigen se manifestă în condiții în care contactul intercelular este exclus. Inițial s-a considerat că acest tip de activare nu este expus restricției CMH. Date recente demonstrează încă că este supus acelorași norme de restricție ca și celulele T_H. Fenomenul s-ar datora intervenției unui factor inductor („helper") specific pentru antigen. Acest factor, cu g.m. 55—80 kdal, izolat din culturile limfocitelor T Lyt-1$^+$, conține determinanți antigenici codificați de regiunea I a CMH și este capabil să inducă *in vitro* activarea celulelor B, controlată de restricția CMH.

Roitt, Brostoff și Male (1985) propun un model molecular de acțiune după care factorul helper este produs de celulele T_H care interacționează cu celulele care prezintă antigenele (CPA). Eliberat în mediu, factorul helper se leagă de suprafața CPA, eventual în asociere cu antigenele. Ulterior, CPA cu factorul helper legat stimulează celulele B, în asociere cu interleukina-1, în cazurile în care CPA este un macrofag (fig. 151).

Mecanismul este supus restricției CMH. Deși factorul specific stimulează celulele B, expansiunea clonală, diferențierea și maturarea lor sînt asigurate de intervenția unor factori nespecifici pentru antigen, BCGF „B-cell growth factor" și BCDF „B-cell differentiation factor" eliberați tot de celulele T_H activate. Ei fac parte din categoria limfokinelor și acționează ca stimulatori policlonali. Cu toate acestea, nu pot acționa pe celulele B în repaus, care nu au receptorii necesari pentru a-i lega, și nici pe celulele B cu specificitate pentru alte antigene, care nu sînt sensibile la acțiunea lor. Efectul lor se exercită după schema următoare : celulele B, care au legat antigenul specific, trec din stadiul Go (în afara ciclului celular) la stadiul G1. Procesul este asociat cu mărirea volumului celular, comparativ cu stadiul Go (110 µm^3 la șoarece), datorită sintezei de ADN. La șoarece, sinteza de ADN și diviziunea celulelor B sînt condiționate de trei semnale : 1) legarea antigenului ; 2) legarea factorului de „creștere" BCGF și 3) legarea IL-1. La om se adaugă necesitatea apariției receptorilor de transferină și a antigenului 4F$_2$, cu funcție necunoscută. În sfîrșit, diferențierea celulelor mărite, proliferante, la stadiul de plasmocit necesită intervenția altui factor ajutător (BCDF) numit, în prezent, TRF („T replacing factor") (fig. 151). Reactivitatea față de TRF implică exprimarea receptorilor corespunzători și a celor pentru

IL-1, precum şi producerea unor modificări caracteristice ale membranei celulare : metilarea fosfolipidelor activarea, serinesterazei etc.

După Ralph şi Kishimoto (1984), proliferarea şi maturarea sînt procese care se exclud reciproc. După trecerea la stadiul de plasmocit, celulă terminală nereplicativă, începe sinteza anticorpilor. Ulterior, probabil alţi produşi ai celulelor T stimulează comutarea sintezei de Ig, de la IgM la IgG, IgA sau IgE.

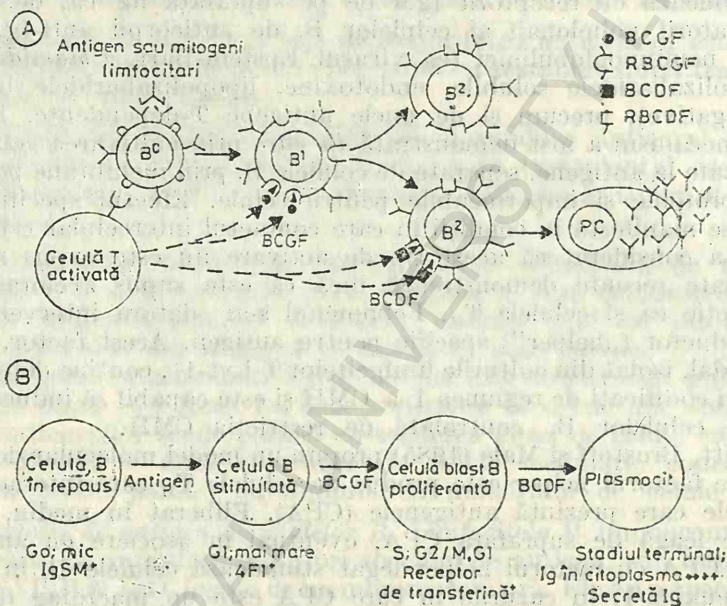
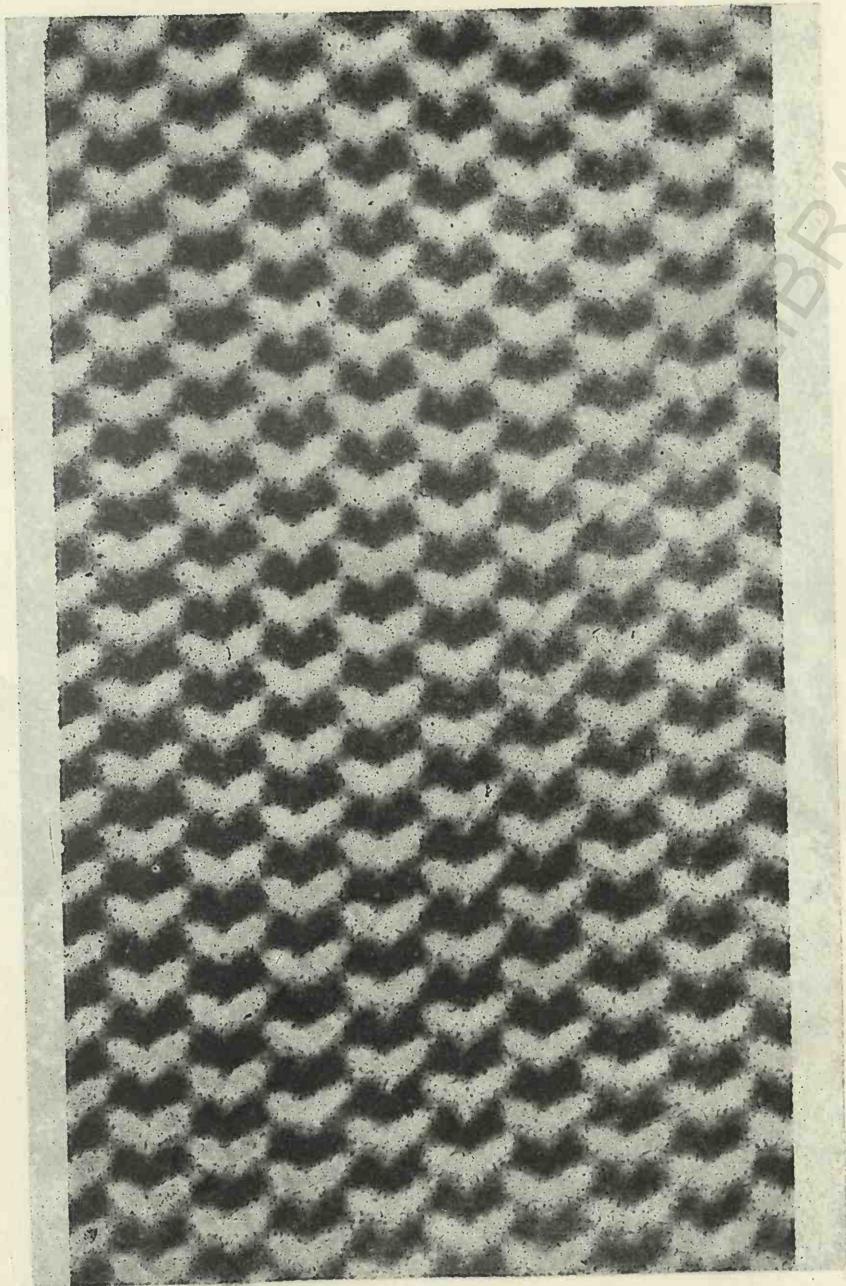
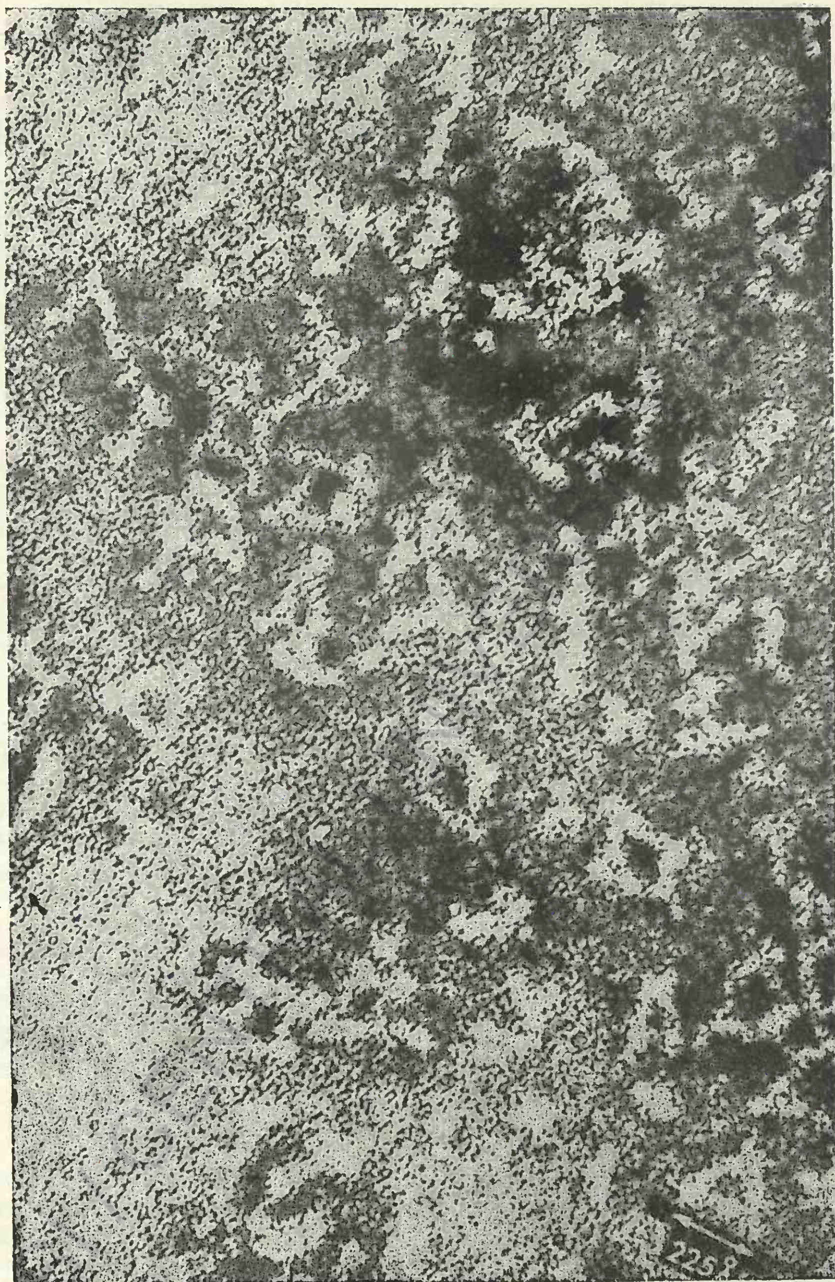


Fig. 151. — Reprezentare schematică a mecanismului de activare a celulelor B cu ajutorul celulelor T. A : BCGF — factorul de creştere a celulelor B ; RBCGF — receptor celular de BCGF ; BCDF — factor de diferenţiere a celulelor B ; RBCDF — receptor celular de BCDF ; B^0, B^1 şi B^2 — trei stadii distincte în diferenţierea celulelor B ; PC — plasmocit (după Levitt şi Cooper, 1984). B. Activitatea factorilor de creştere şi de diferenţiere a celulelor B (după Zola, 1985).

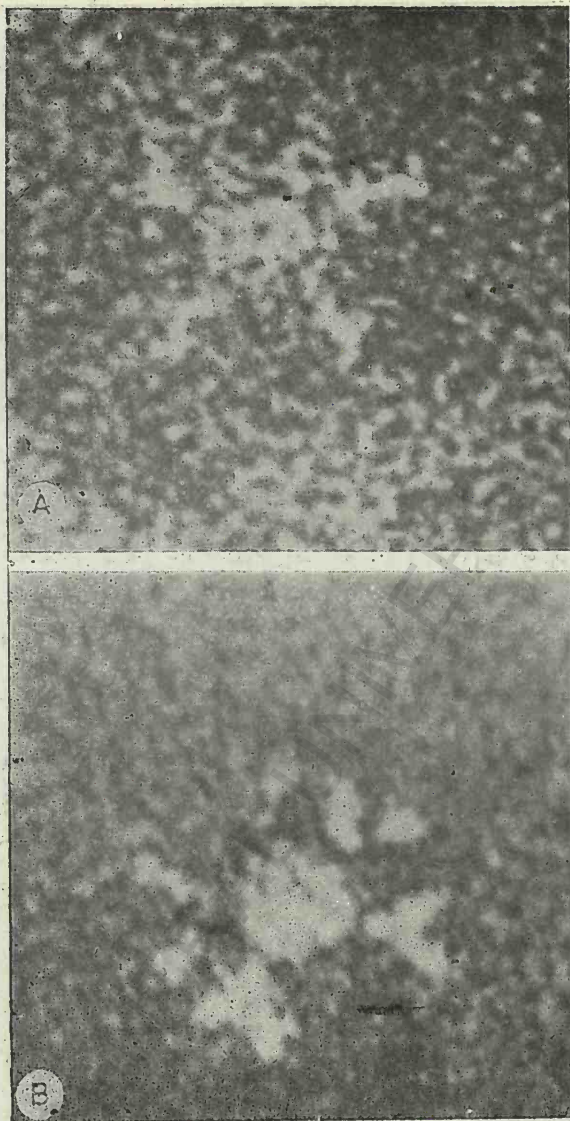
Interacţiunea directă dintre celulele T_H şi B. Cooperarea directă dintre celulele T_H şi B este caracteristică celulelor Lyb-5⁻, a căror particularitate fundamentală este de a răspunde la antigenele T-dependente (celulare şi proteice), precum şi la unele substanţe cu capacitate mitogenă intrinsecă (lipopolizaharide bacteriene). Nu răspund la polizaharide solubile. Ea implică contactul direct dintre celulele T_H şi B specifice pentru acelaşi antigen. El pare să aibă rolul de a focaliza sau concentra antigenul pe suprafaţa celulelor B, într-un mod adecvat pentru a iniţia activarea. Şi în acest caz, activarea implică exprimarea receptorilor capabili să lege factorii de creştere (BCGF) şi de diferenţiere (BCDF). Condiţia fundamentală pentru realizarea acestui tip de activare este ca atît celulele T, cît şi celulele B, să provină de la acelaşi individ sau de la indivizi foarte înrudiţi, deci să aibă, la om antigenele HLA—DR identice sau foarte



Pl. 1 — Molecule de anticorpi, în formă de Y, provenite de la un caz de mielom multiplu, evidenţiate prin microelectronografia unui cristal de Ig umane. Imaginea este bazată pe interferenţa fasciculului de electroni prin cristal, mărirea rezoluţiei prin tehnica lui Labaw şi Davies şi repetarea procesului printr-un artificiu de tehnică adecvat obţinerii acestui aspect (după Capra şi Edmundson, 1977).



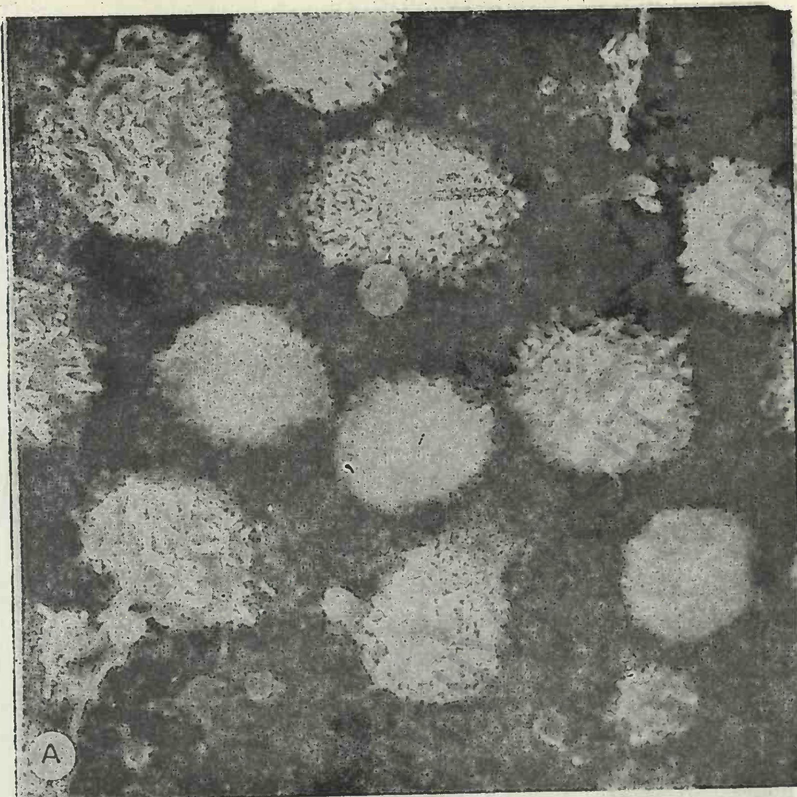
Pl. 2 — Microelectronografia complexelor formate de anticorpii γG de iepure anti-2,4-dinitrofenil (DNP) cu reactivul bifuncţional bis-N-DNP octametilendiamină (după Valentine şi Green, 1967).

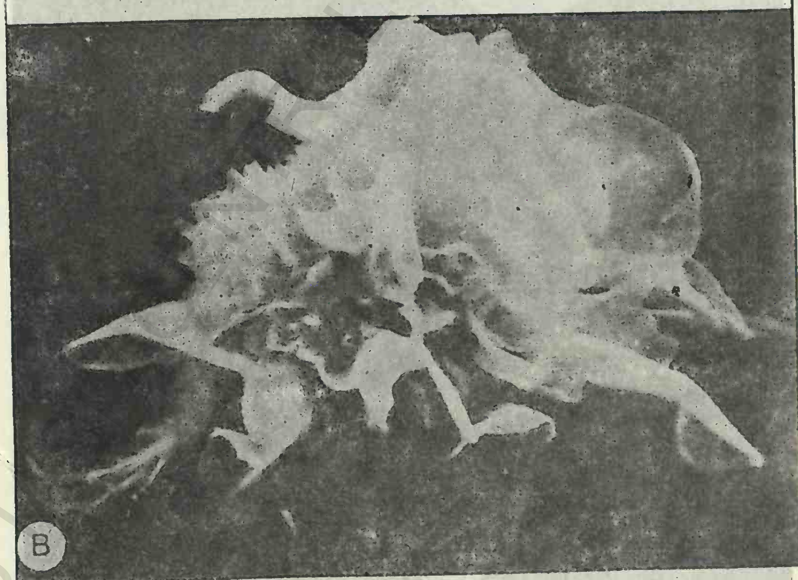


Pl. 3 — Microelectronografia moleculelor de IgM individuale, evidenţiate prin coloraţie negativă. A : imagine caracteristică, prezentînd cinci „picioare" reunite de un inel central. B : imagine în care fiecare „picior" este divizat în două (după Feinstein şi Munn, 1970).



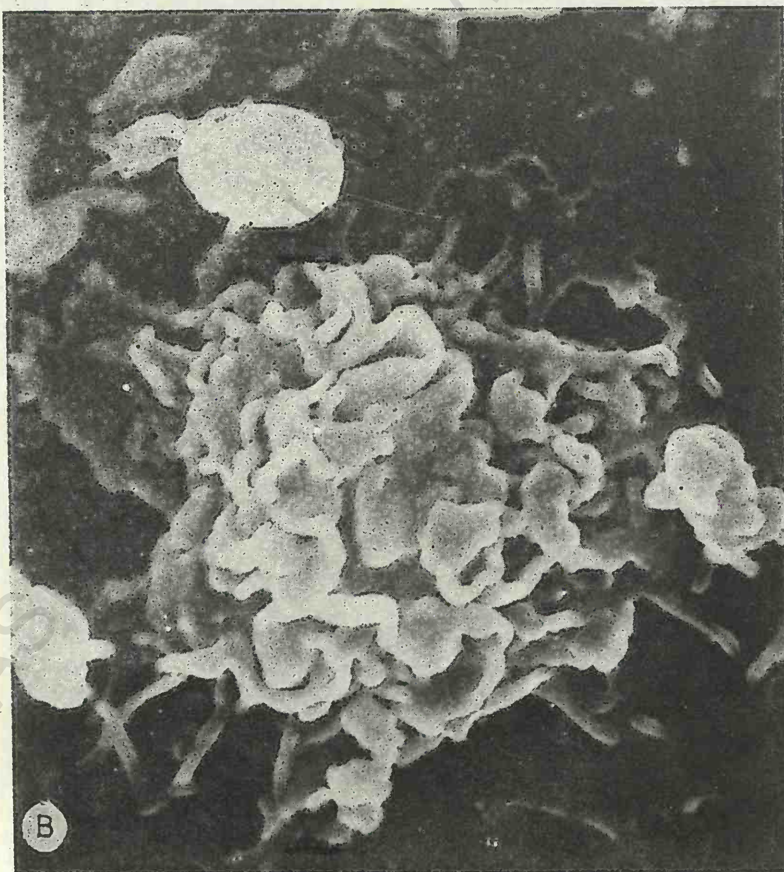
Pl. 4 — Monocit uman matur din singe. Microelectronografia evidenţiază nucleul (n), citoplasma voluminoasă, ce conţine organitele asociate cu sinteza proteinelor şi cu exportul produşilor de secreţie (er reticulul endoplasmatic rugos şi complexul Golgi (G). Peroxidaza este prezentă numai în granulaţiile g1 şi absentă în g2, er şi G. Secţiunea mai evidenţiază un centriol (ce) şi citeva mitocondrii (m) (după Bainton, 1980).

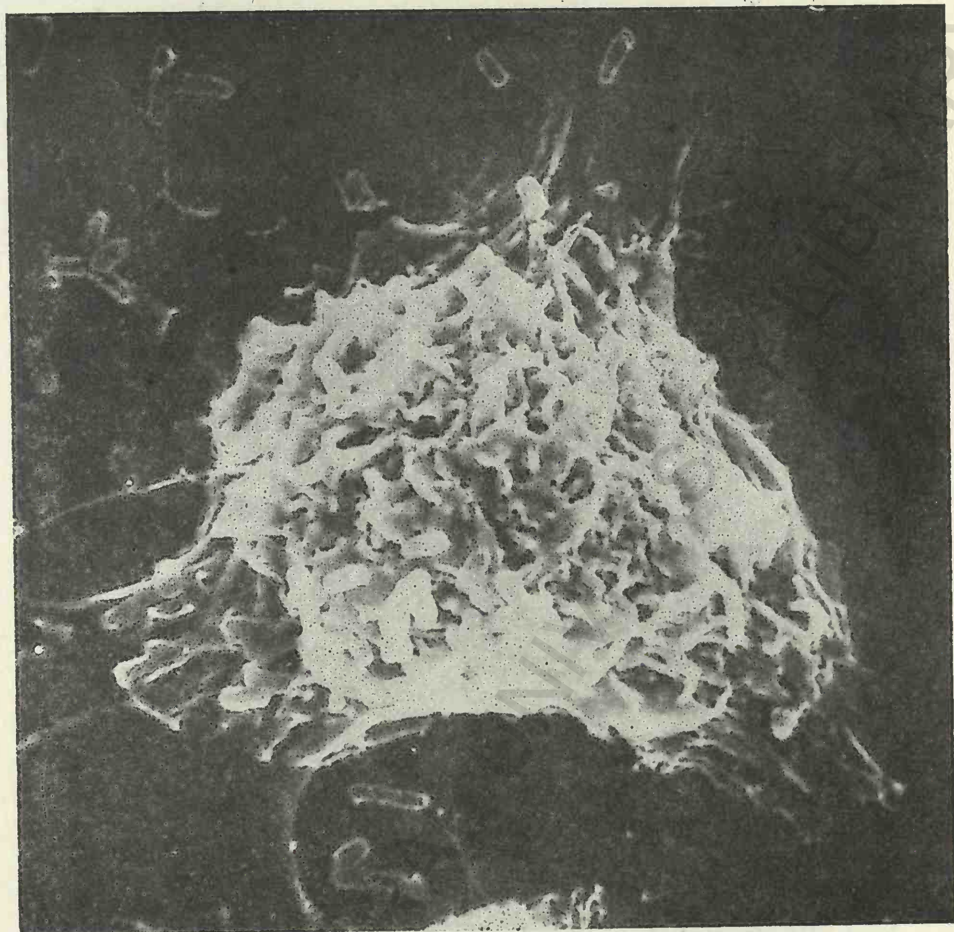




Pl.5 — Macrofage. A : microelectronografie în scanning (după Manolescu, 1987), B : macrofag peritoneal de iepure. Suprafața celulei este acoperită de membrane ondulante laminare, de diferite forme și mărimi (microelectronografie în scanning, după Warfel și Elberg, 1975).

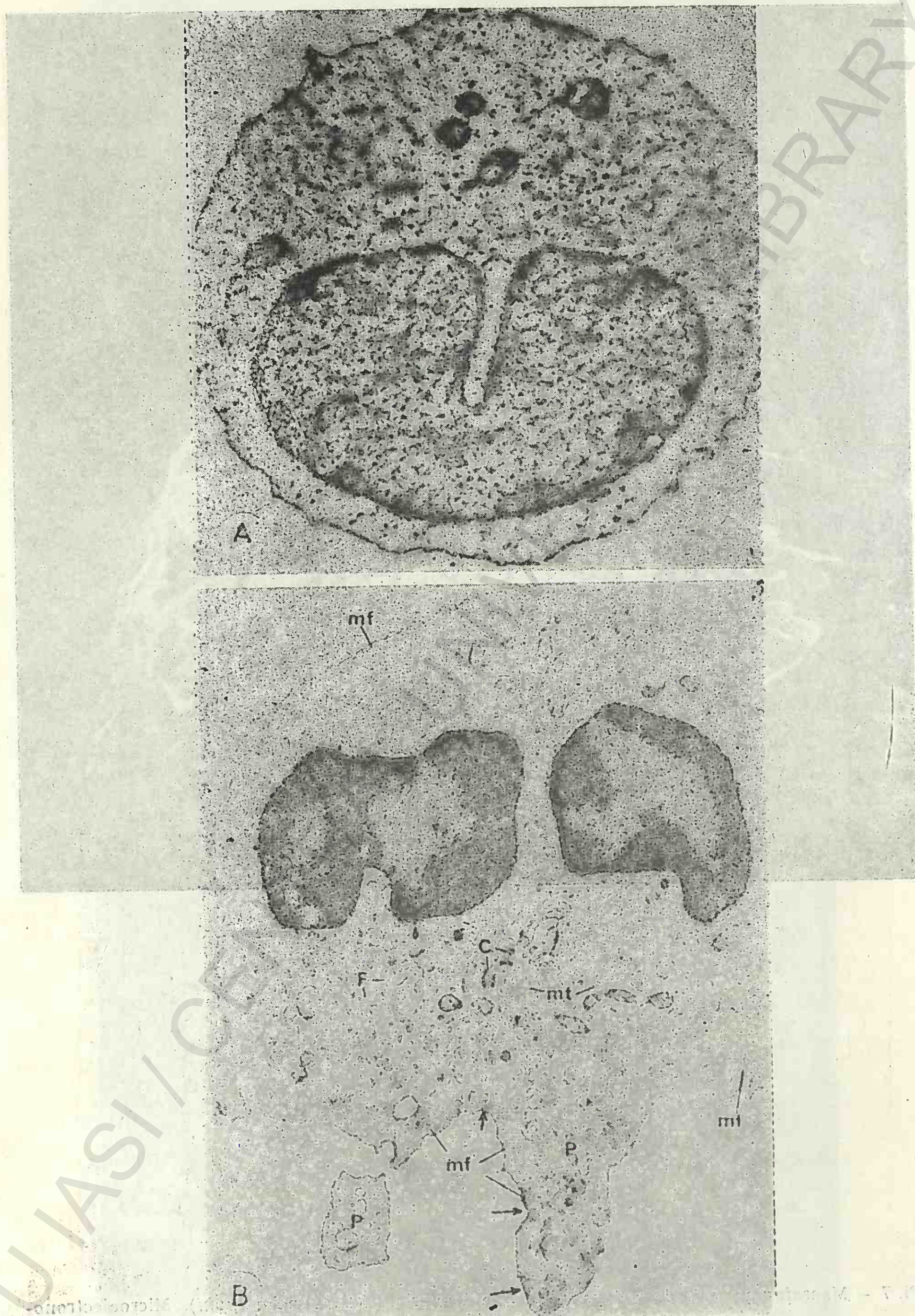

A


B

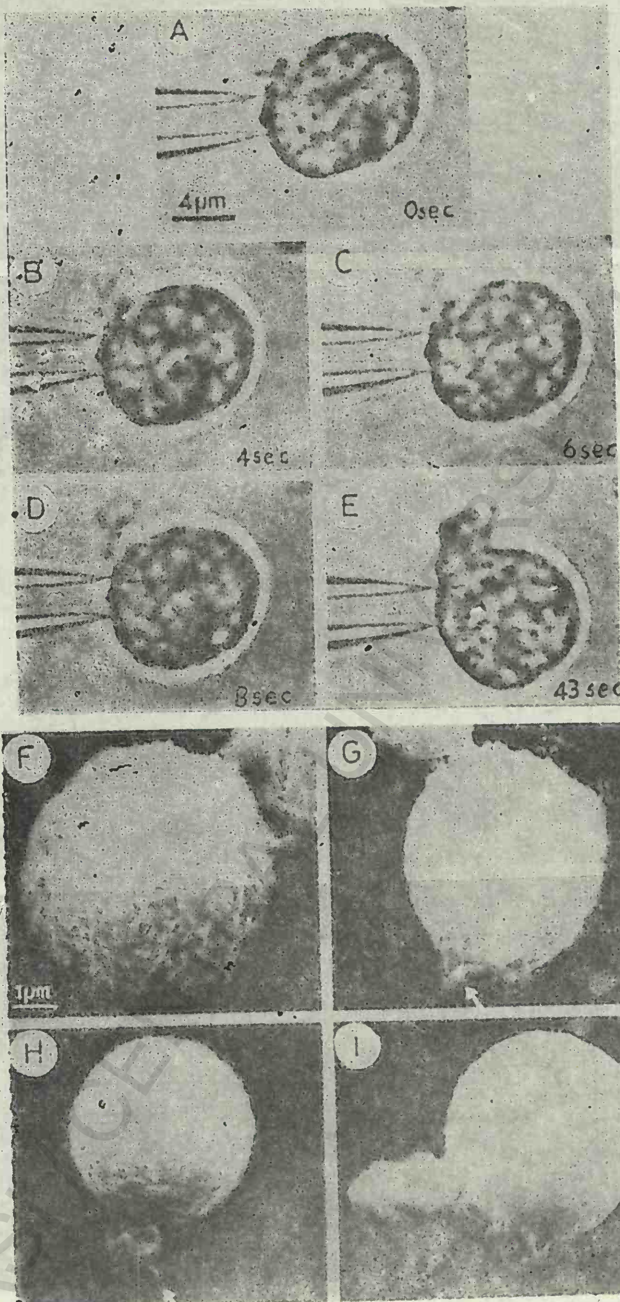


Pl. 7 — Macrofag pe cale de a fagocita celule bacteriene (*Salmonella typhi*). Microelectronografie în scanning (× 12 000) (după Manolescu, 1987).

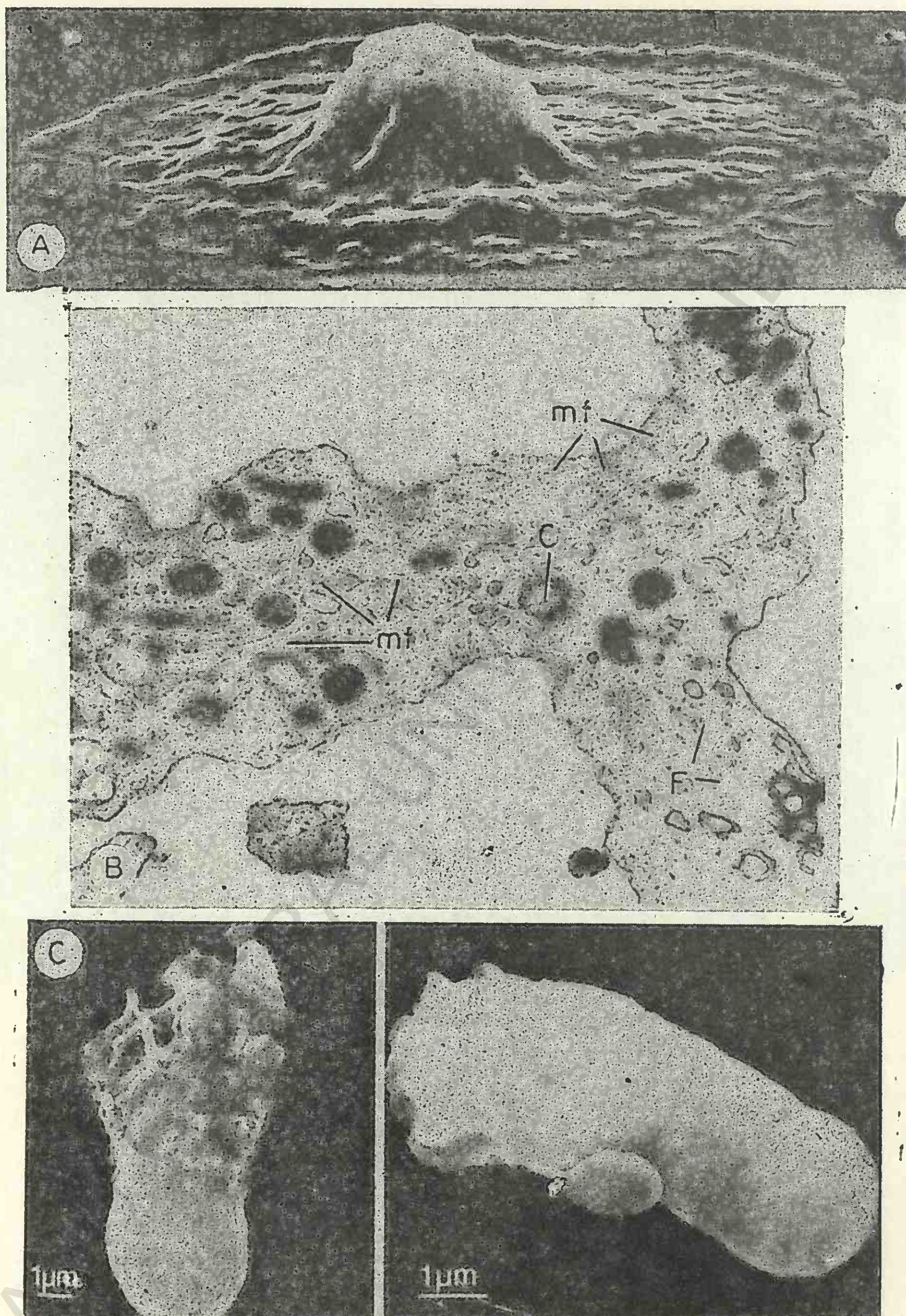
⟵
Pl. 6 — A. Macrofag încărcat cu granule de zimozan acoperite cu feritină, în faza de aderență de suprafață și internalizate (microelectronografie (după Bockman, 1987). B. Suprafața unui macrofag, evidențiată pe micrografie electronică în scanning (×12 000, după Manolescu, 1987).



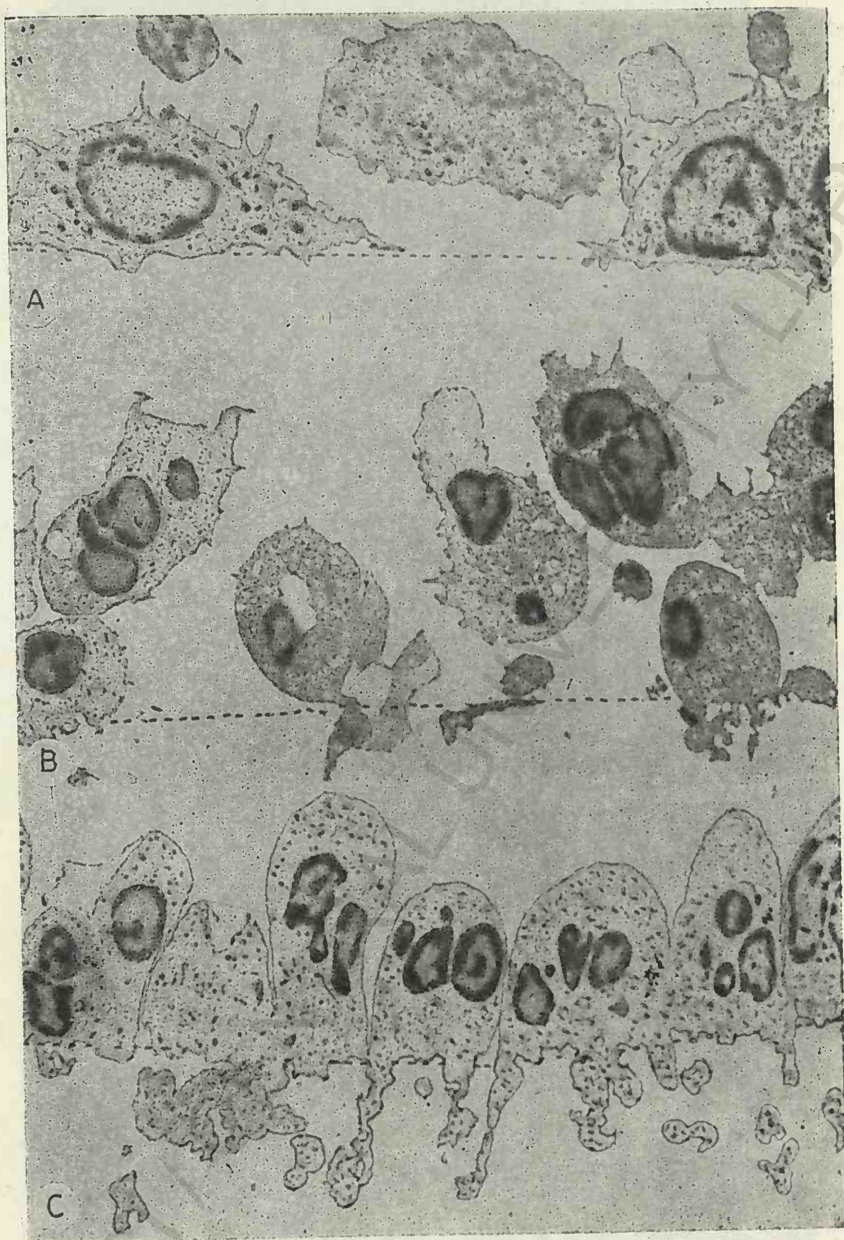
Pl. 8 — **A.** Granulocit neutrofil în repaus, cu nucleu caracteristic în potcoavă (după Boccarelli, 1969). Microelectronografia unei secțiuni ultrafine. **B.** Granulocit neutrofil orientat pentru migrare printr-un filtru cu pori cu Ø de 0,45 μm, în gradient de ser cu endotoxină de *E. coli*: mf — microfilamente submembranare, formînd în unele zone agregate laxe, ce alternează cu regiuni cu densitate mărită (↙↗); C — centriol; mt — microtubuli; F — fascicule de filamente groase (100Å); P — pseudopode (după Gallin, 1980).



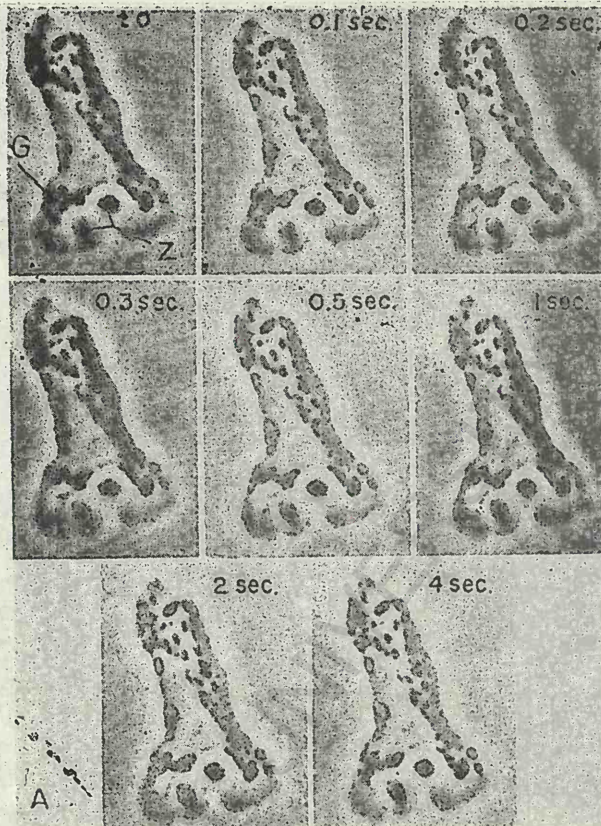
Pl. 9 — A — E. Secvenţa formării protopodelor unui neutrofil uman, evidenţiată pe un ecran de televiziune. Extremitatea protopodului se deplasează spre exterior, ca un corp rigid, fără nici o altă modificare de formă. Celula este liberă în suspensie, exceptînd faptul că este împiedicată să se deplaseze din cîmpul microscopului printr-o aspiraţie uşoară cu o pipetă (după Schmid-Schönbein, Skalak şi Chien, 1986. F — I. Stadiile succesive ale procesului de formare a pseudopodelor la granulocitele neutrofile umane (microelectronografie în scanning, după Schmid—Schönbein şi colab., 1986).



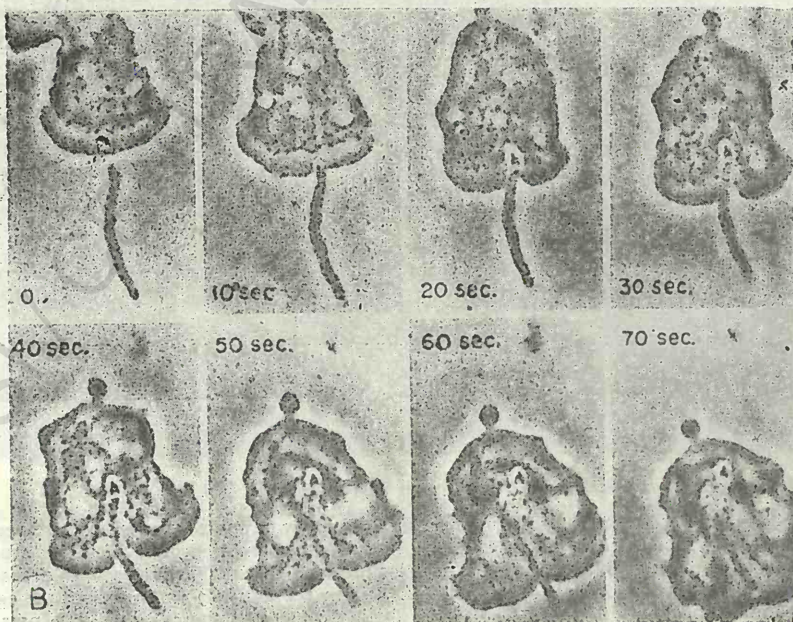
Pl. 10 — **A.** Microelectronografie în scanning, evidenţiind modificările morfologice asociate cu locomoţia şi deplasarea unui granulocit neutrofil pe un suport solid (după Bessis, 1977). **B.** Microelectronografia pseudopodului unui granulocit neutrofil în cursul trecerii prin porii unui filtru de celuloză; C — centriol migrat profund în pseudopod; mt — microtubuli; mf — fascicule de microfilamente submembranare; F — filamente groase dispuse în unele regiuni paralel cu microtubulii (după Gallin, 1980). **C.** Deformările unui neutrofil uman în cursul formării pseudopodului. Imaginea evidenţiază „gîtuitura" corespunzătoare interfeţei dintre regiunea citoplasmei nepolimerizate şi protopodul propriu-zis (după Schmid-Schönbein şi colab., 1986).



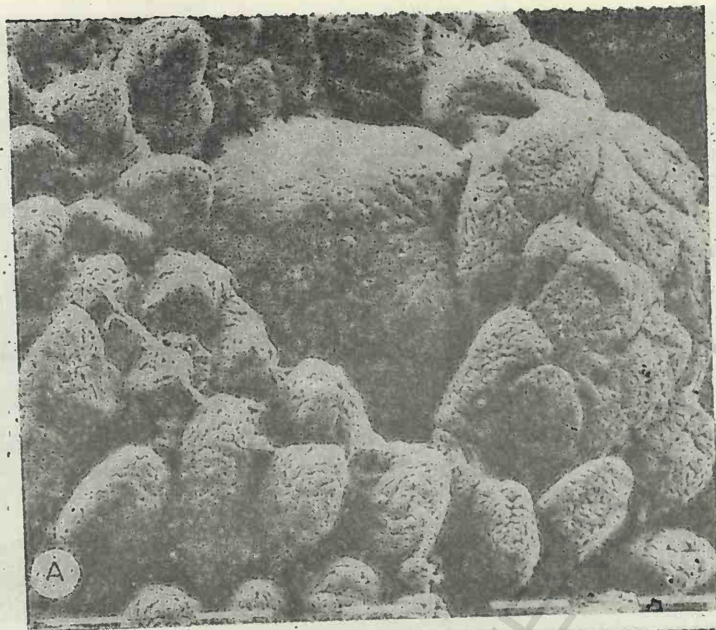
Pl. 11 — **A**. Microelectronografia unor neutrofile umane pe suprafaţa unui filtru de celuloză (— — —), cu pori de 0,45 μm, în condiţii de deplasare aleatorie, în absenţa unui factor chemotactic. **B**. Aspectul neutrofilelor incubate în condiţii activate, în prezenţa factorului chemotactic (endotoxina de *E. coli* în ser activat) în concentraţii egale de ambele părţi ale filtrului. **C**. Migrare dirijată; factorul chemotactic este prezent numai sub filtru (după Malech şi colab., 1977).

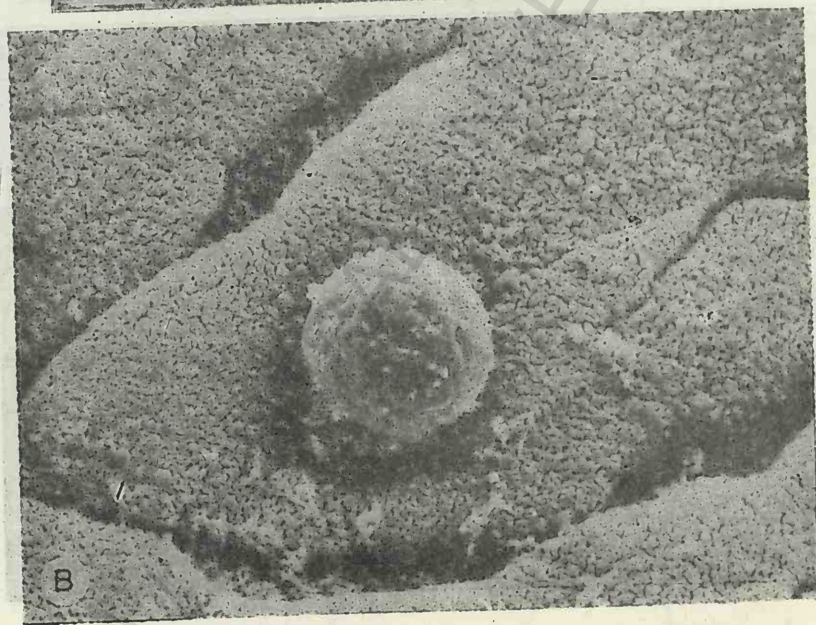


0
0.1 sec.
0.2 sec.
G
Z
0.3 sec.
0.5 sec.
1 sec.
2 sec.
4 sec.
A



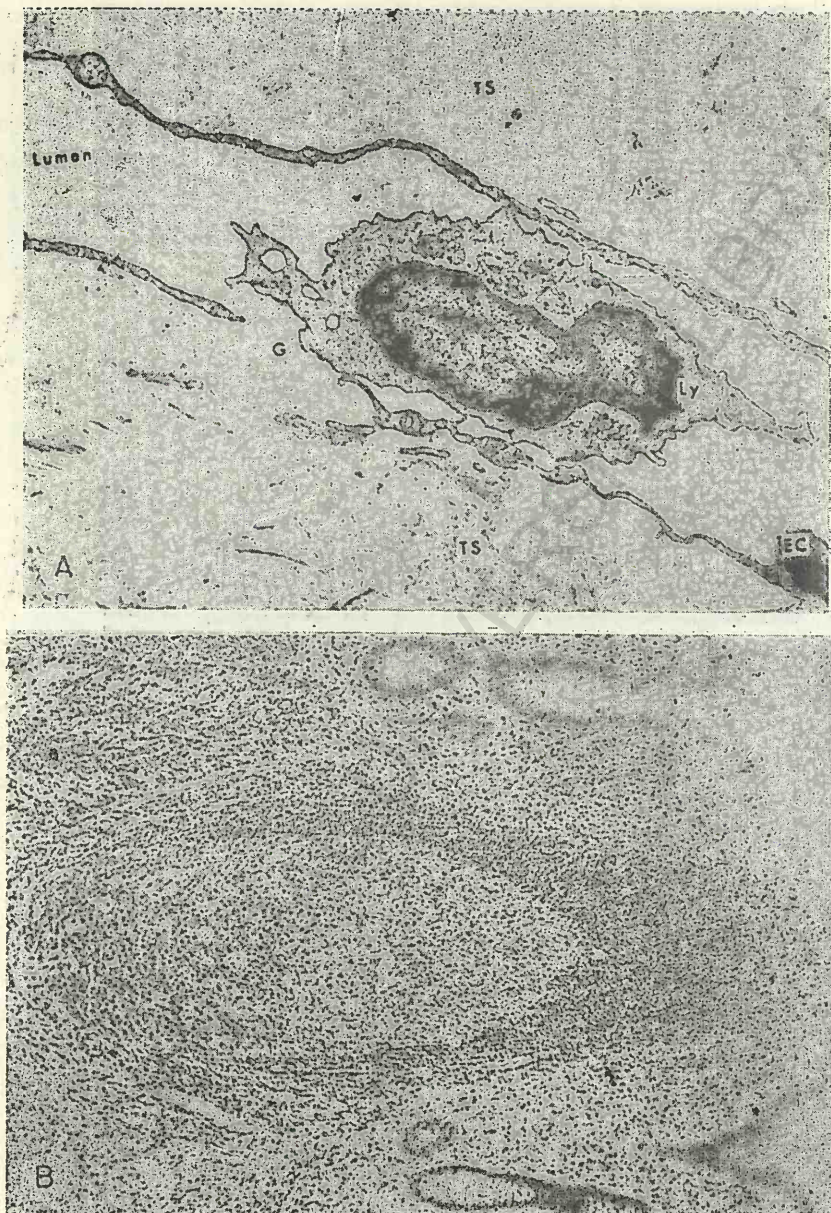
0.
10 sec
20 sec.
30 sec.
40 sec.
50 sec.
60 sec.
70 sec.
B



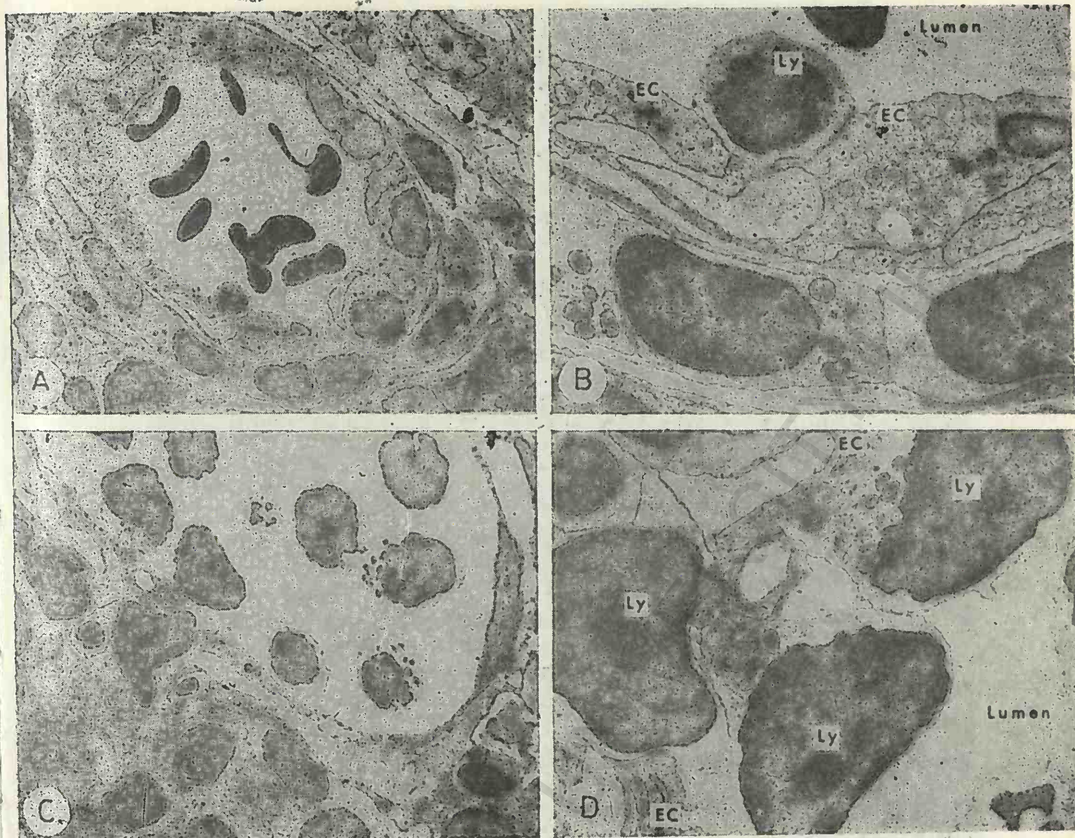


Pl. 13 — A. Aspectul unei plăci Peyer după patru zile de la infecţia cu *Treponema spiralis*, evidenţiind atrofia vilozităţilor în regiunea din dreapta a domului (microelectronografie în scanning, după Parrot, 1987). B. Imaginea mărită a epiteliului domului plăcii Peyer, evidenţiind un limfocit migrat la suprafaţa acestuia (microelectronografie în scanning, după Parrot, 1987).

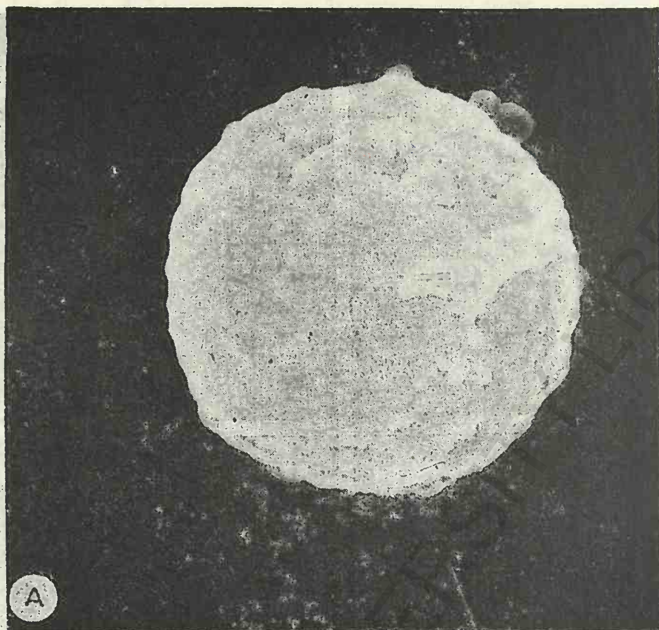
⟵
Pl. 12 — Fagocitoza. A. Dinamica înglobării unor particule de zimozan de către un granulocit neutrofil. B. Fazele fagocitozei unei celule de *Bacillus megaterium* (după Hirsch, 1969).

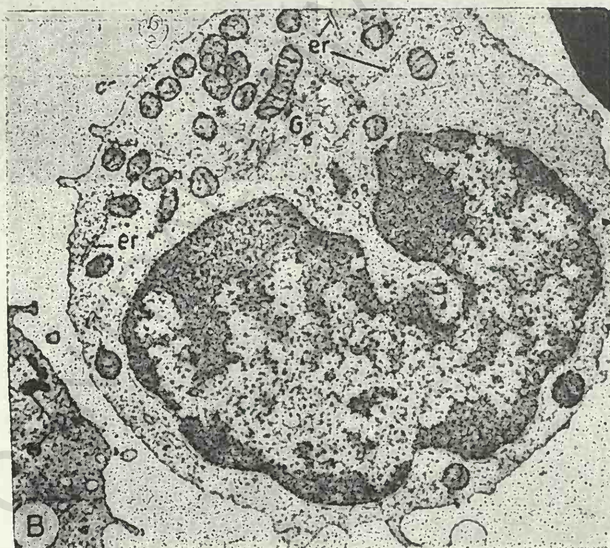


Pl. 14 — A. Microelectronografie prezentînd o secțiune longitudinală printr-un capilar limfatic terminal din peretele uterului de oaie: G — breșă largă în peretele capilarului; Ly — limfocit în lumenul vasului; EC — celulă endotelială; TS — spațiu tisular (după Smith, 1970). B. Nodul limfatic reactiv din apendicele uman conținînd macrofage, cu mulți corpi „colorabili" („tingible"), înconjurate de o manta de limfocite, care se contopesc cu zona celulară mixtă sub epiteliul domului. Epiteliul domului conține limfocite intraepiteliale (după Parrot, 1987).

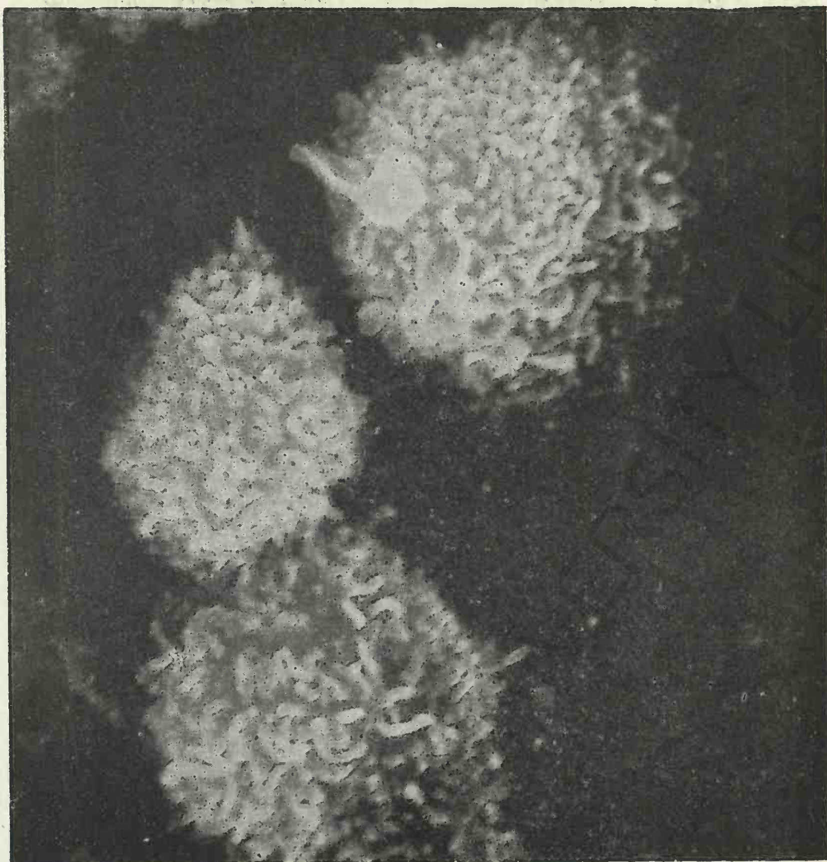


Pl. 15— Migrarea limfocitelor din circulaţia sanguină în ţesuturi. A. Venulă postcapilară dintr-o placă Peyer de la şobolan, prezentînd multe limfocite subendoteliale şi unul care se insinuează printre două celule endoteliale (EC). B. Mărirea unei porţiuni din figura A evidenţiază prelungirile citoplasmatice ale limfocitului migrator (Ly) între două celule endoteliale adiacente (după Smith şi colab., 1970). Migrarea limfocitelor din ţesuturi în circulaţia limfatică. C. Microelectronografia unui capilar limfatic din plăcile Peyer de la şobolan, evidenţiind prezenţa mai multor limfocite şi granulocite în lumen. Unele limfocite apar în cursul trecerii printr-o breşă a endoteliului limfatic. D. Imaginea mărită a unei porţiuni din figura A evidenţiază trei limfocite în cursul migrării lor printre două celule adiacente (după Smith şi colab., 1970).

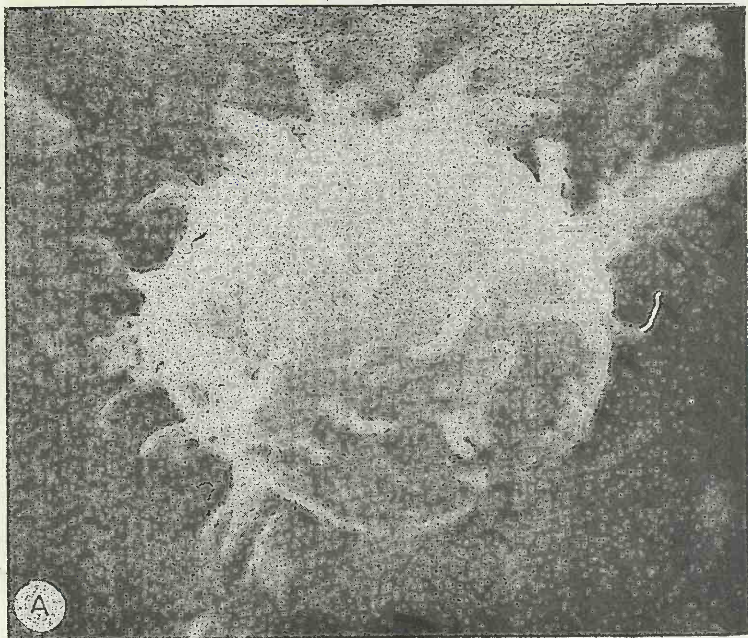


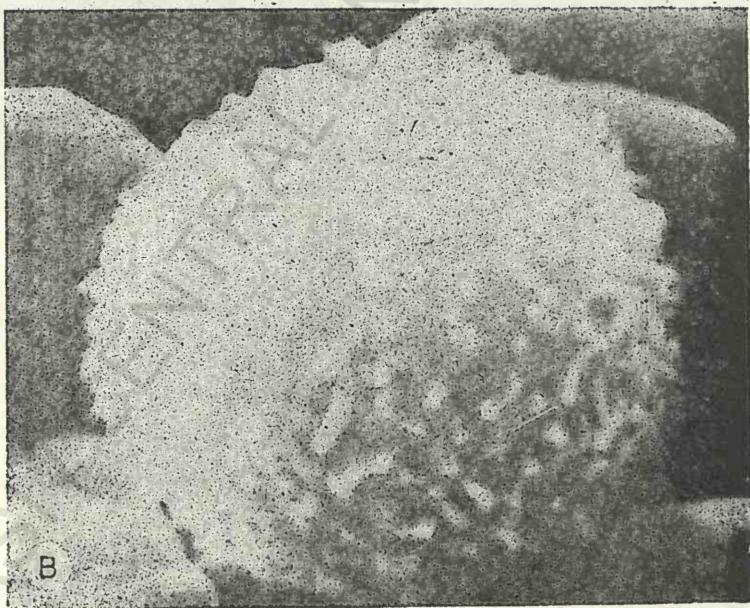


Pl. 16 — A. Microelectronografia în scanning a unui limfocit T (× 7 500) (după Manolescu, 1987). **B.** Microelectronografia unui limfocit din sîngele uman normal, evidenţiind numeroşi ribosomi liberi, reticulul endoplasmatic (er) relativ redus; complexul Golgi (G), m — mitocondrii (m) (după Bainton, 1980).

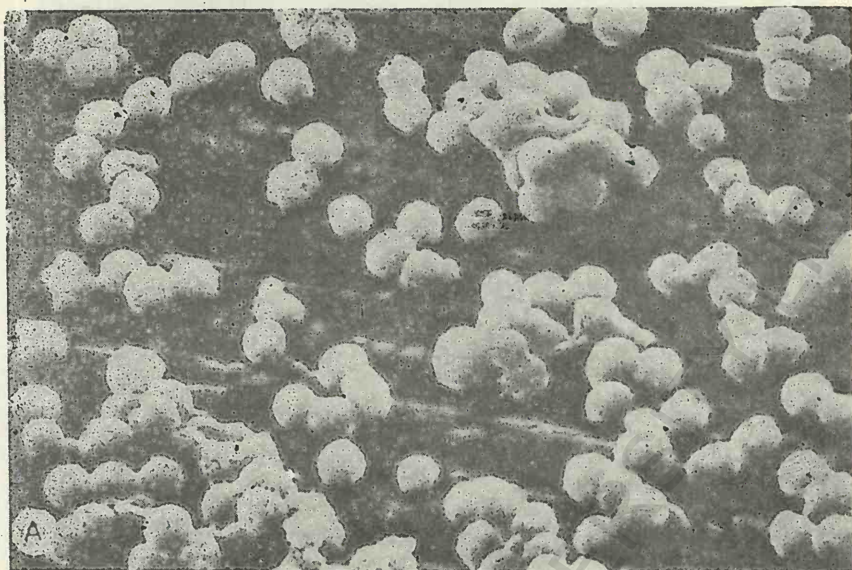


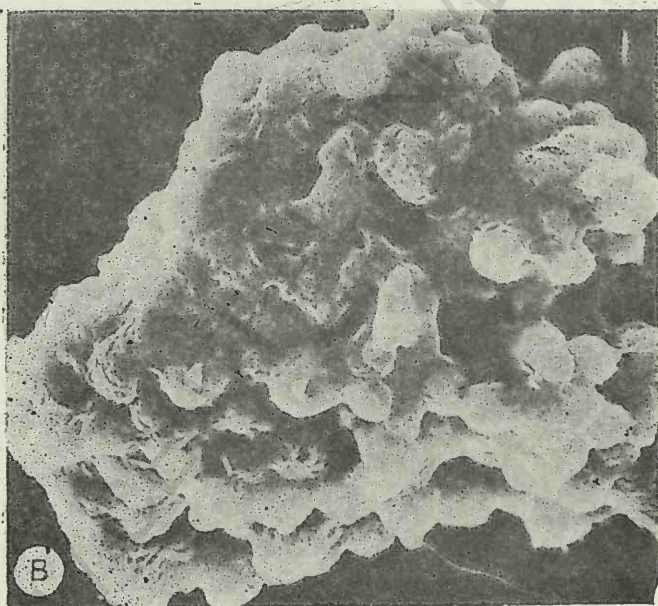
Pl. 17 — Limfocite B. Microelectronografie în scanning (× 6 000) (după Manolescu, 1987).



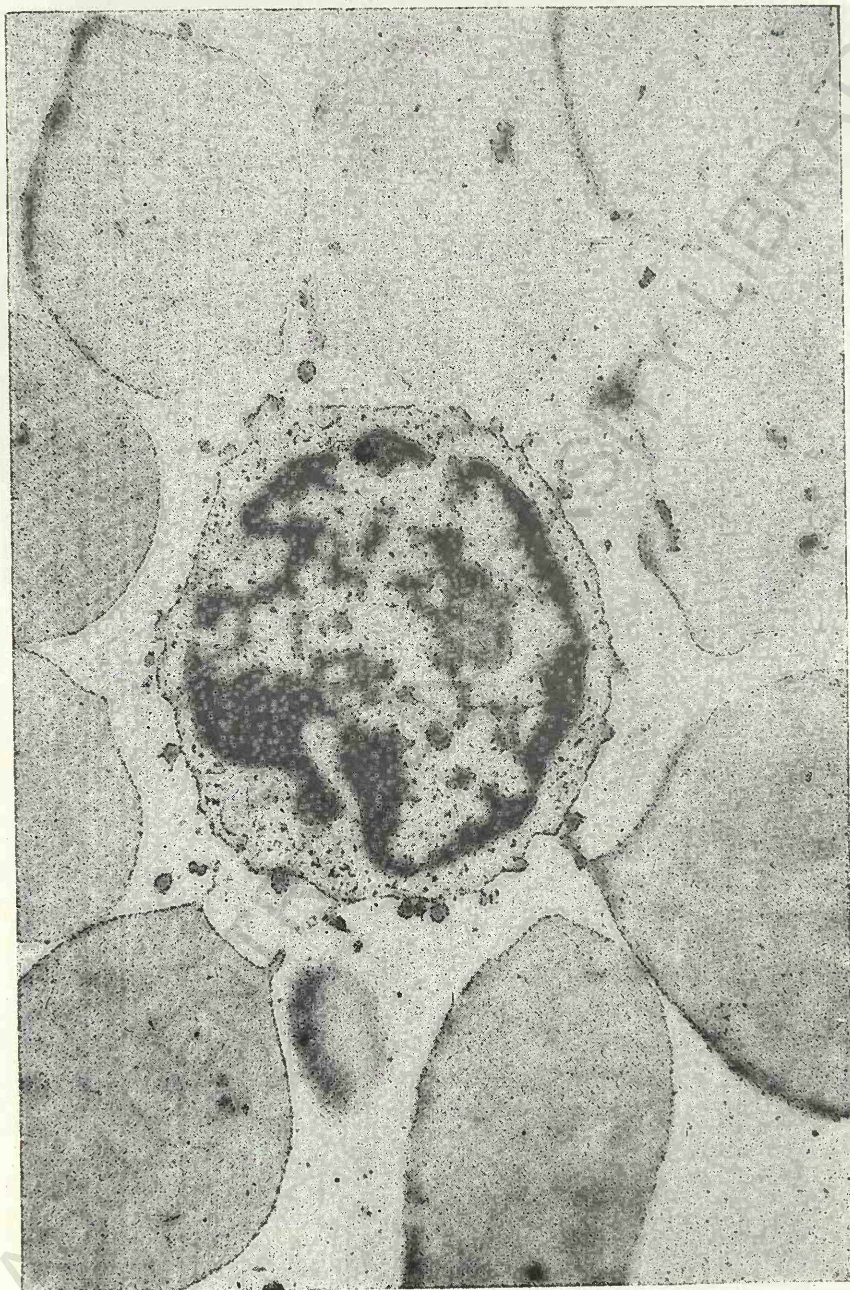


Pl. 18 — Diferenţele morfologice în structura „microvilozităţilor" de pe suprafaţa limfocitelor. **A** : limfocit normal, cu „vilozităţi" mari şi aspect de castană sălbatică. **B** : limfocit provenit din splina unui şoarece „nud", atimic congenital (după Criswell şi colab., 1975).

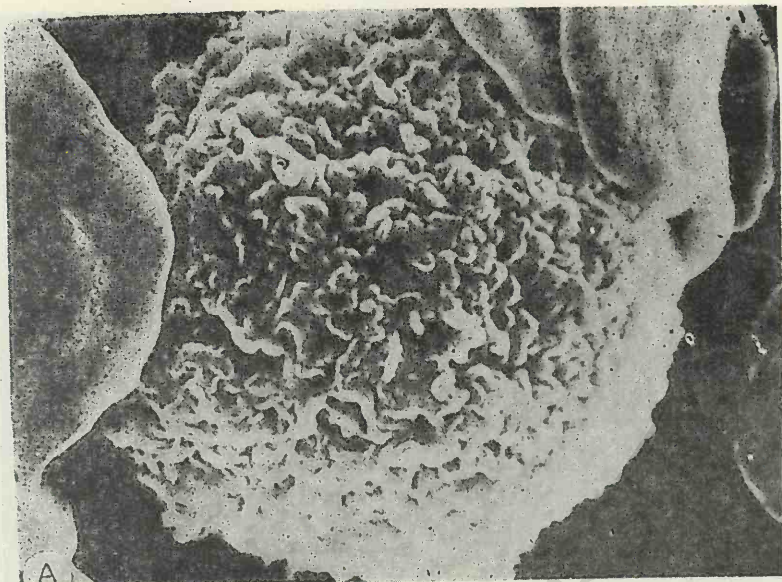


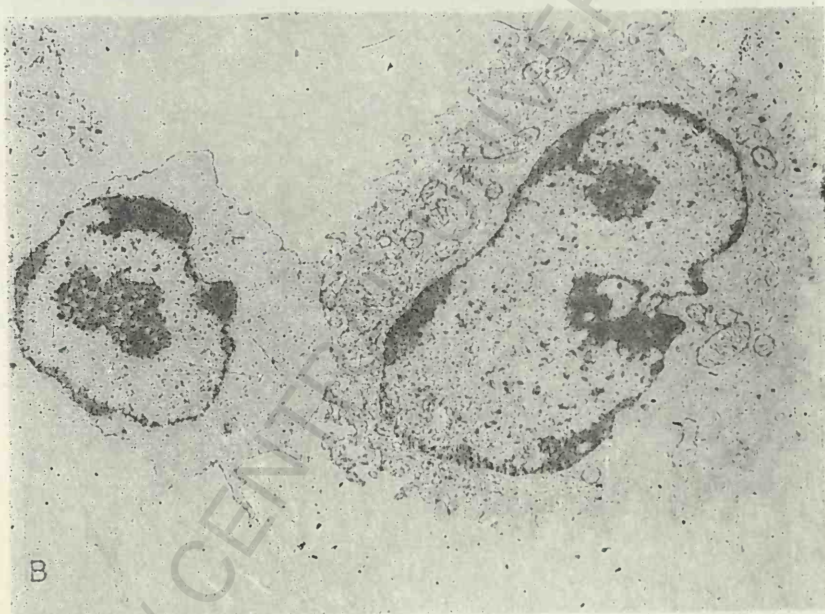


Pl. 19 — Limfocite netratate cu fitohemaglutinină. A. Celulele cu dimensiuni și forme aproximativ asemănătoare sint distribuite în grupuri mici sau izolate. B. Agregate de limfocite stimulate cu fitohemaglutinină. Celulele par acoperite de un veal continuu (microelectronografii în scanning din Rassegna Medica).

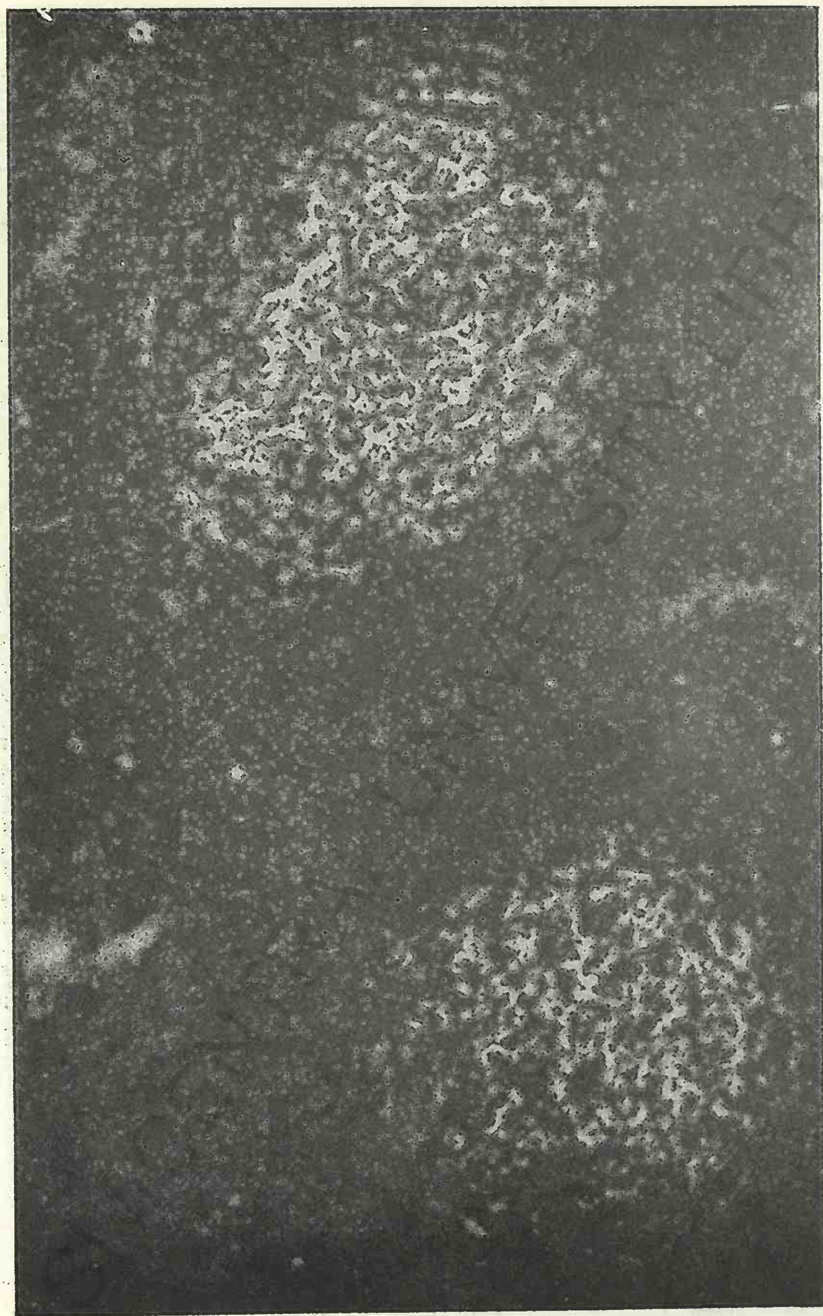


Pl. 20 — Aspect de „rozetă" : aderenţa hematiilor în jurul unui limfocit (microelectronografie, după Reyes şi J. F. Bach, 1973).

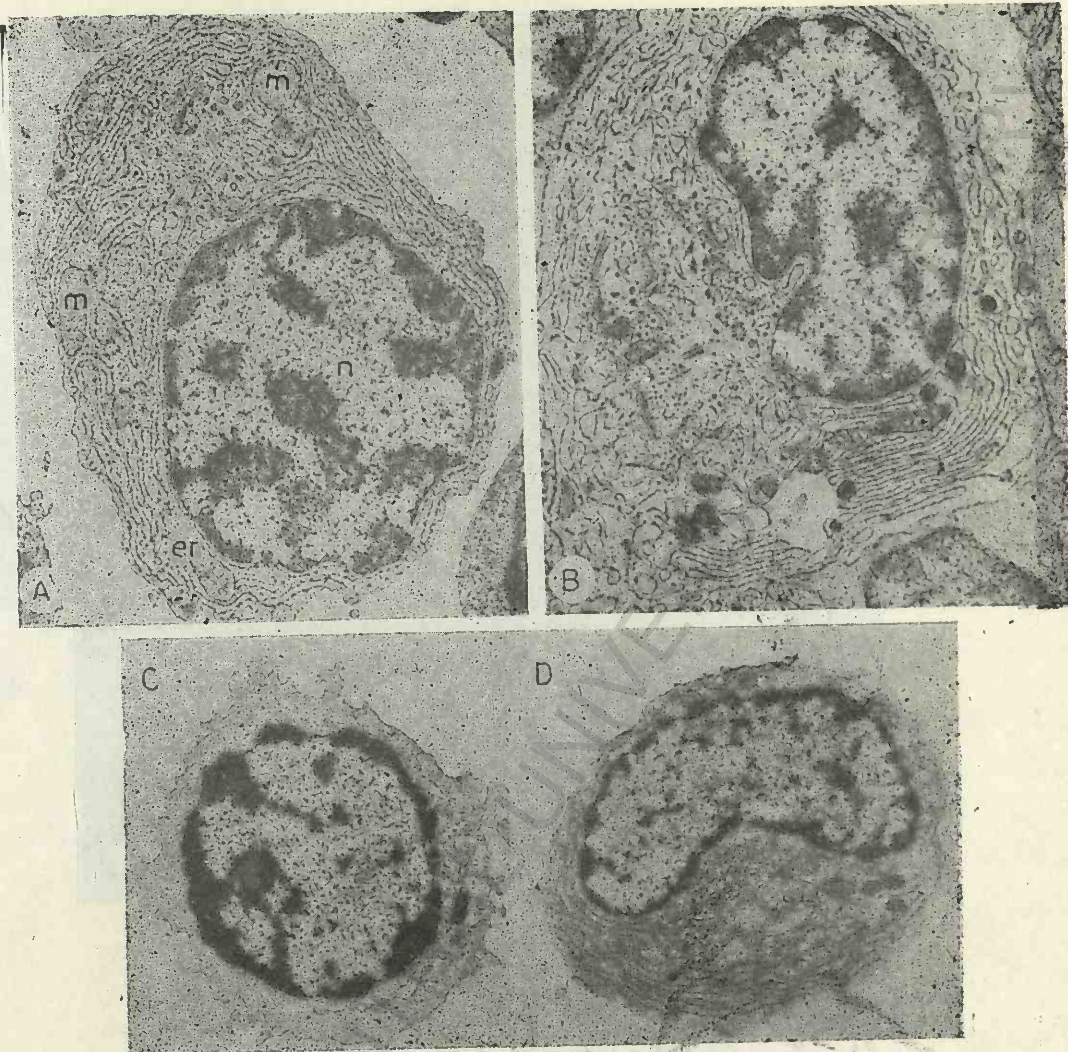




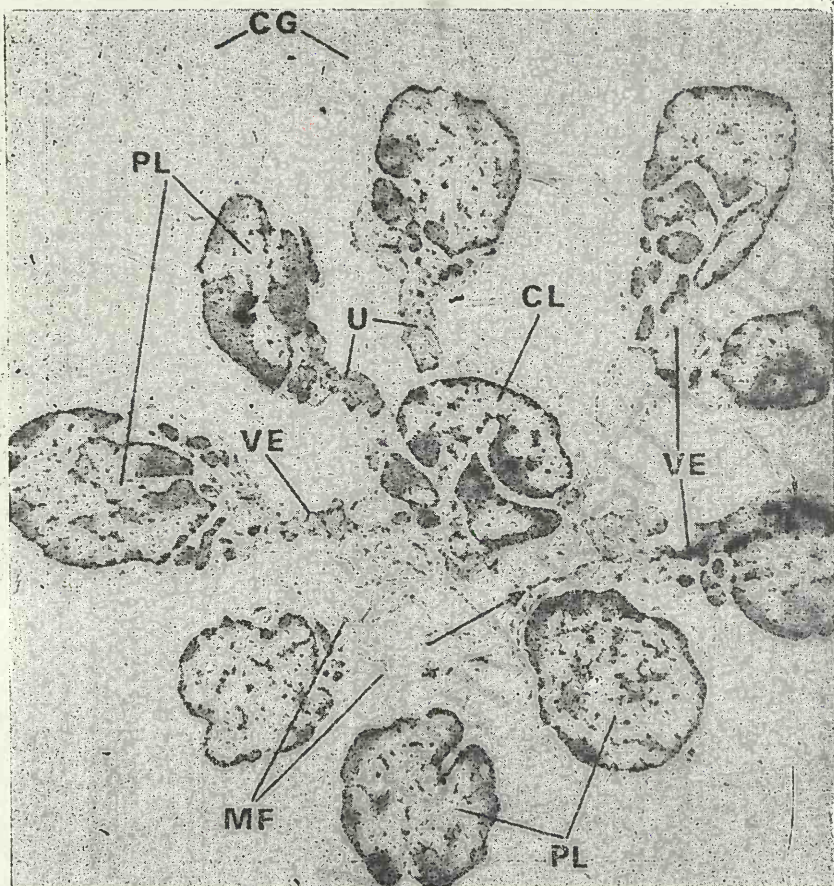
Pl. 21 — A. Aspectul unui limfocit înconjurat de cîteva hematii (microelectronografie în scanning (A) (din Rassegna Medica). Interacţiuni celulare în cursul răspunsului imun. B. Limfocit activat, asociat fizic cu un macrofag care prezintă antigenul (microelectronografie după Rosenthal şi colab., 1980).



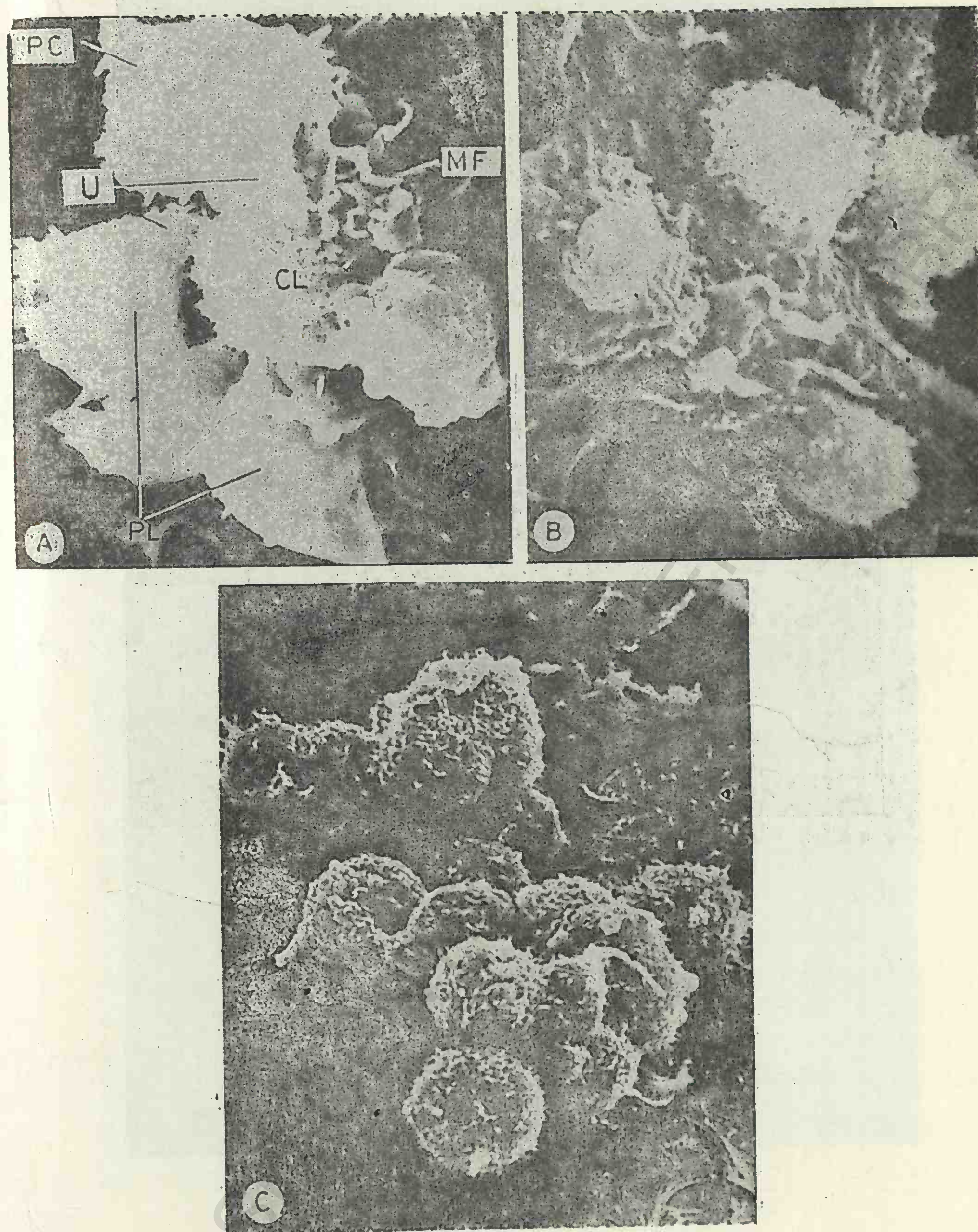
Pl. 22 — Evidenţierea centrilor germinativi dintr-un ganglion limfatic. Celulele formatoare de anticorpi sînt localizate în regiunile fluorescente (albe în imagine). Astfel de celule nu apar în afara centrilor germinativi (după Mellors şi Korngold, 1968).



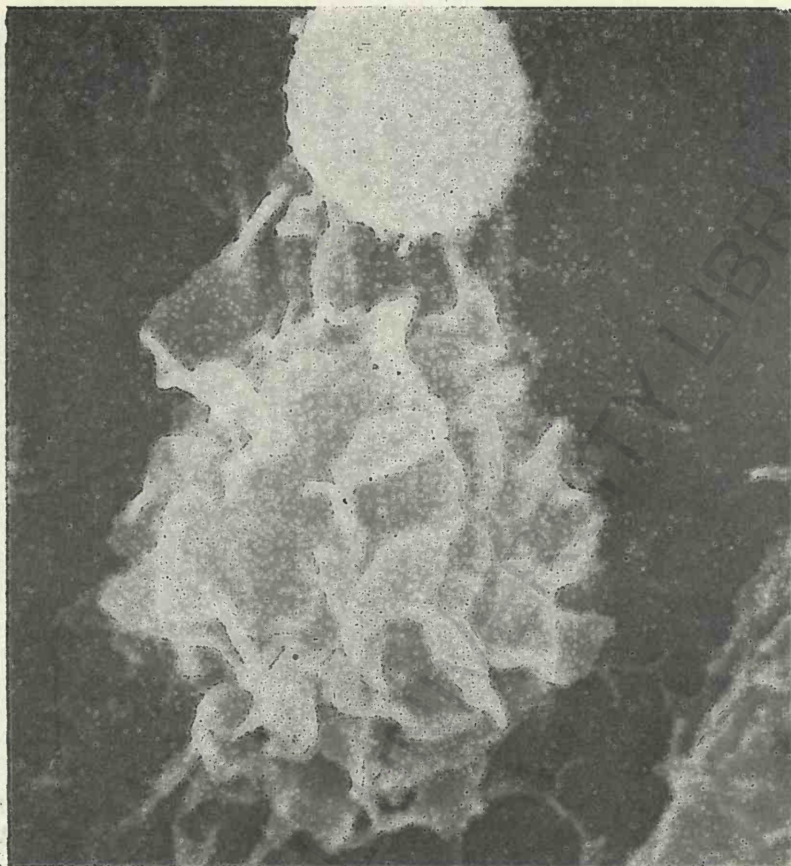
Pl. 23 — **A.** Plasmocit din măduva oaselor de iepure: er – reticul endoplasmic rugos; G — complex Golgi; m — mitocondrie; N – nucleu situat excentric. Microelectronografie pe secţiuni ultrafine (după Bainton, 1980). **B.** Plasmocit de la maimuţa *Callitrix*. Microelectronografia evidenţiază reticulul endoplasmic rugos şi o zonă Golgi, bogat dezvoltată, în regiunea din dreapta nucleului (după Junquiera, 1986). Ultrastructura comparată a unui limfocit B (C) şi a unui plasmocit imatur din sîngele periferic uman (D) (microelectronografie, după Cooper, Kearney şi Scher, 1984).



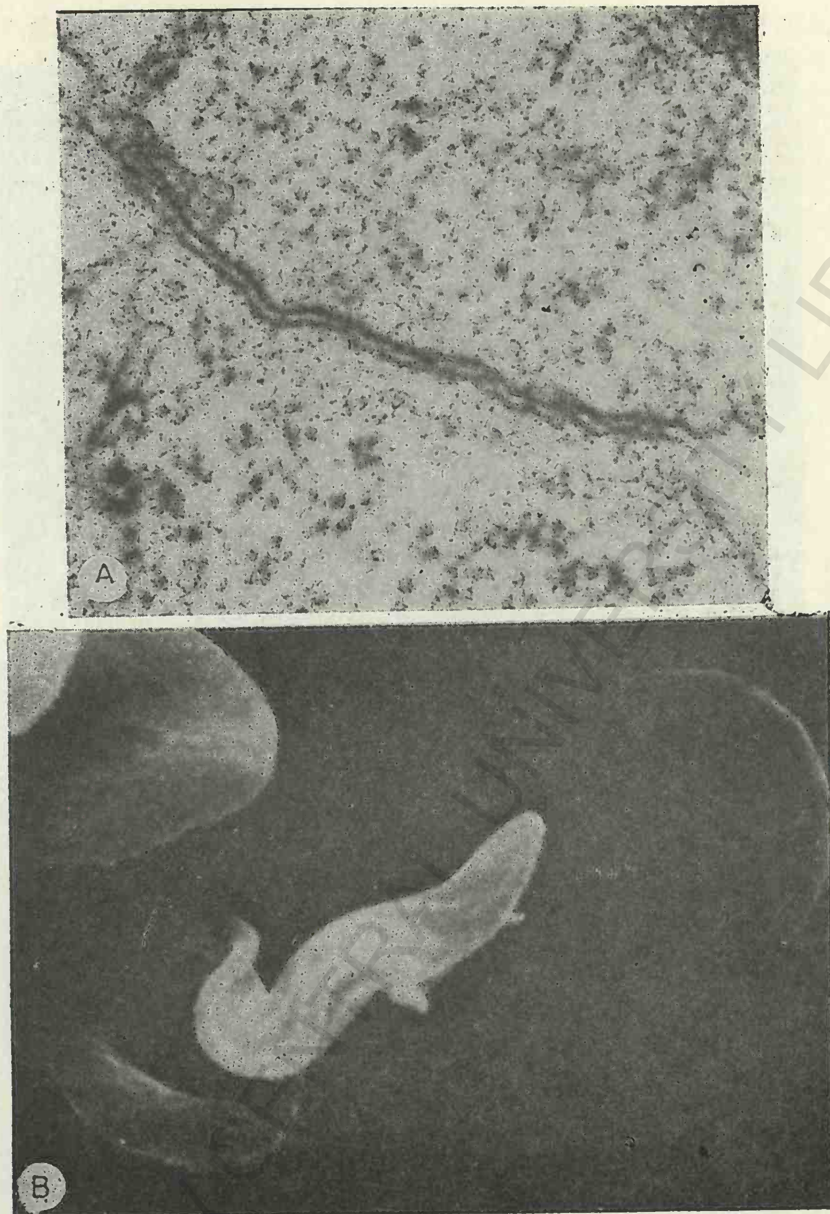
Pl. 24 — Interrelaţii celulare în cursul răspunsului imun. Limfocitele periferice (PL), prezentînd uropode (U), sînt legate de suprafaţa unui limfocit central. Microelectronografia evidenţiază prezenţa în celule şi în unele uropode a unor vezicule translucide (VE) la electroni şi piiurile membranei de pe suprafaţa unui macrofag (MF). CG — secţiune transversală printr-un protopod al limfocitelor periferice (după Nielson, 1984).



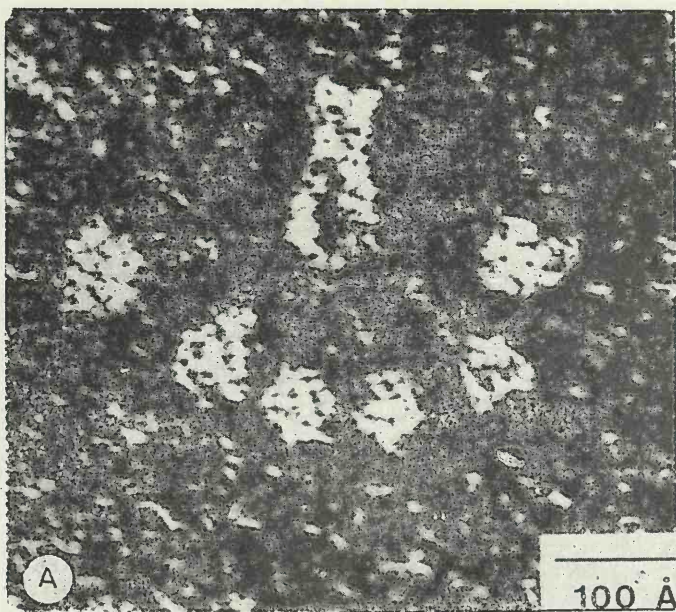
Pl. 25 — Interacţiuni celulare în cursul răspunsului imun. A. Microelectronografie în scanning prezentînd agregate de limfocite periferice (PL) în jurul unui limfocit central (CL). MF — macrofag; U — uropod; PC — pseudopod cristat (după Nielson, 1984). B. Microelectronografia în scanning a unui macrofag care a înglobat celule de *Listeria monocitogenes*, pe suprafaţa căruia au aderat patru limfocite T specifice pentru *Listeria* (după Marx, 1987). C. Agregate limfocitare în cursul răspunsului imun.

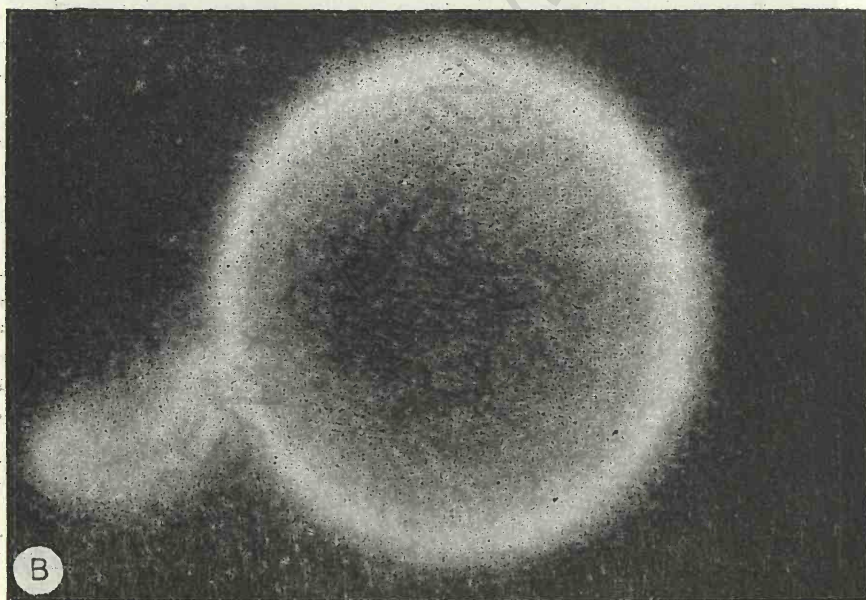


Pl. 26 — Citotoxicitatea mediată de macrofage. Microelectronografie în scanning, evidenţiind interacţiunea dintre un macrofag „killer" şi un limfocit B leucemic (× 6 000) (după Manolescu, 1987).

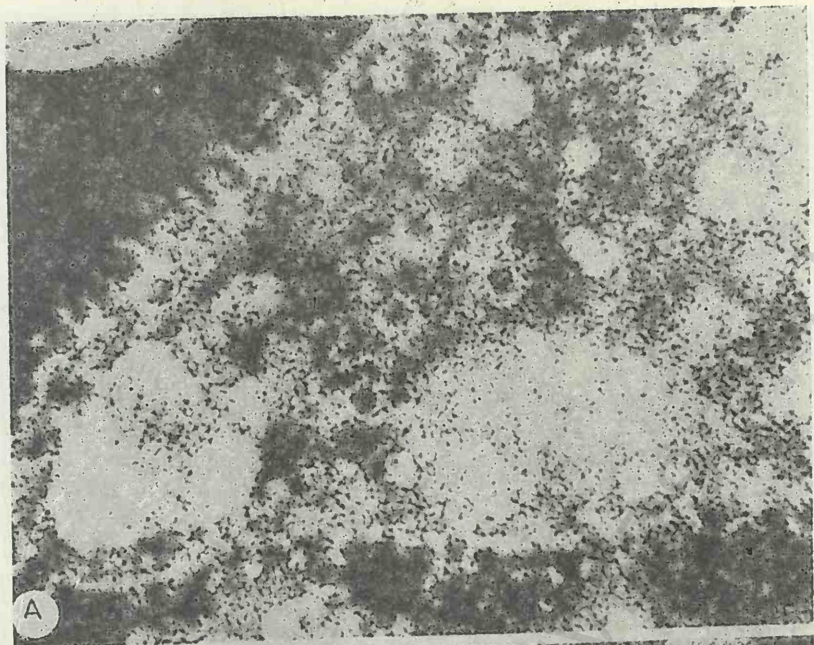


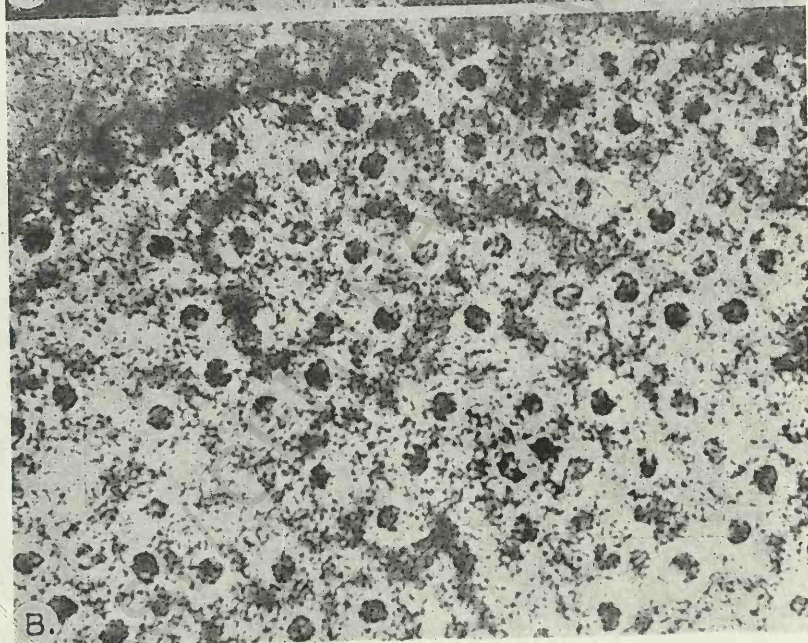
Pl. 27 — Interacţiuni celulare în cursul răspunsului imun. A. Aspect de detaliu al zonei de contact dintre o celulă T (jos) şi o celulă-ţintă de mielom multiplu alogenic (sus). Membranele citoplasmatice ale celor două celule, aflate în contact pe o suprafaţă mare, sînt separate de un spaţiu clar de 15 — 20 nm. (microelectronografie, după Mandel, 1977). B. *Trypanosoma brucei* izolată, evidenţiată printre hematii (microelectronografie în scanning, după Donelson şi Rice Ficht, 1985).



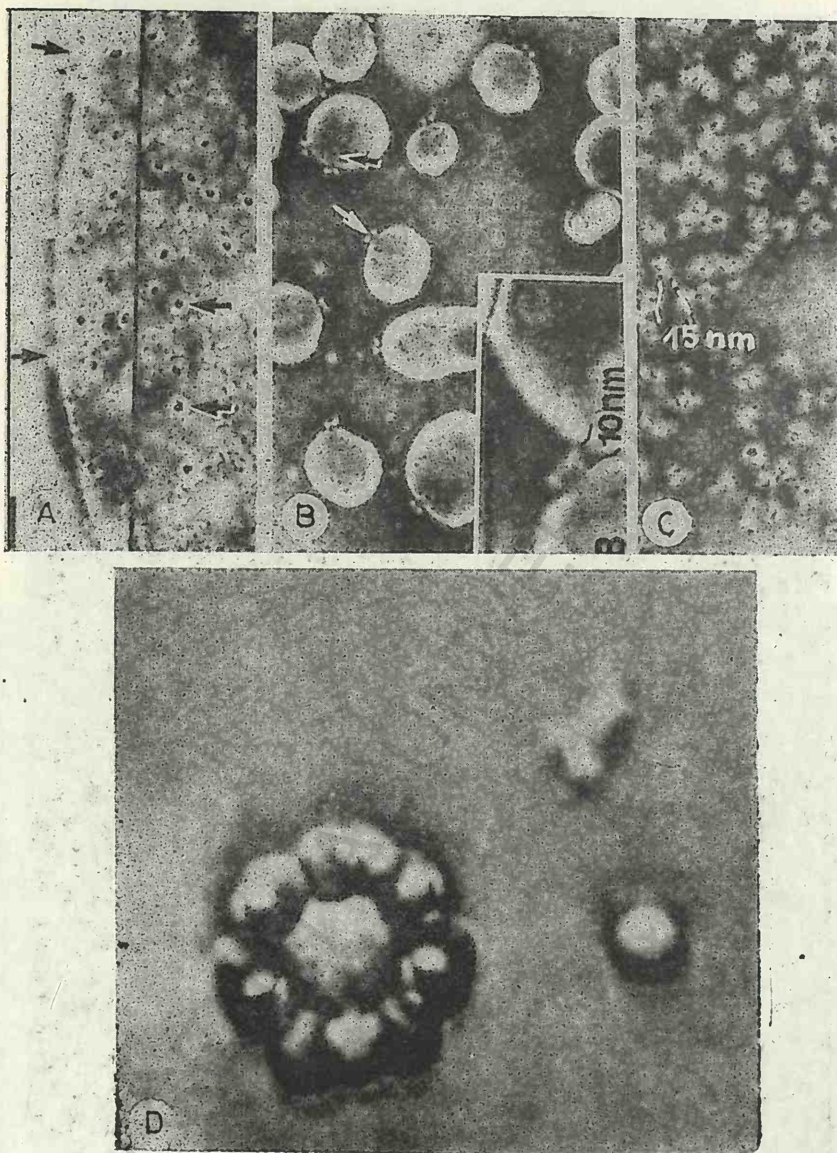


Pl. 28 — Microelectronografia componentului C1q (vedere laterală). **A.** Subunitatea centrală pare să fie divizată longitudinal în două secțiuni. Subunitatea centrală are o lungime de 105Å, iar cele periferice > 65Å (după Knoebel, 1984). **B.** Aderența unei celule de *Streptococcus pneumoniae*, tratată cu anticorpi și complement, pe suprafața unei hematii (din Rassegna Medica).

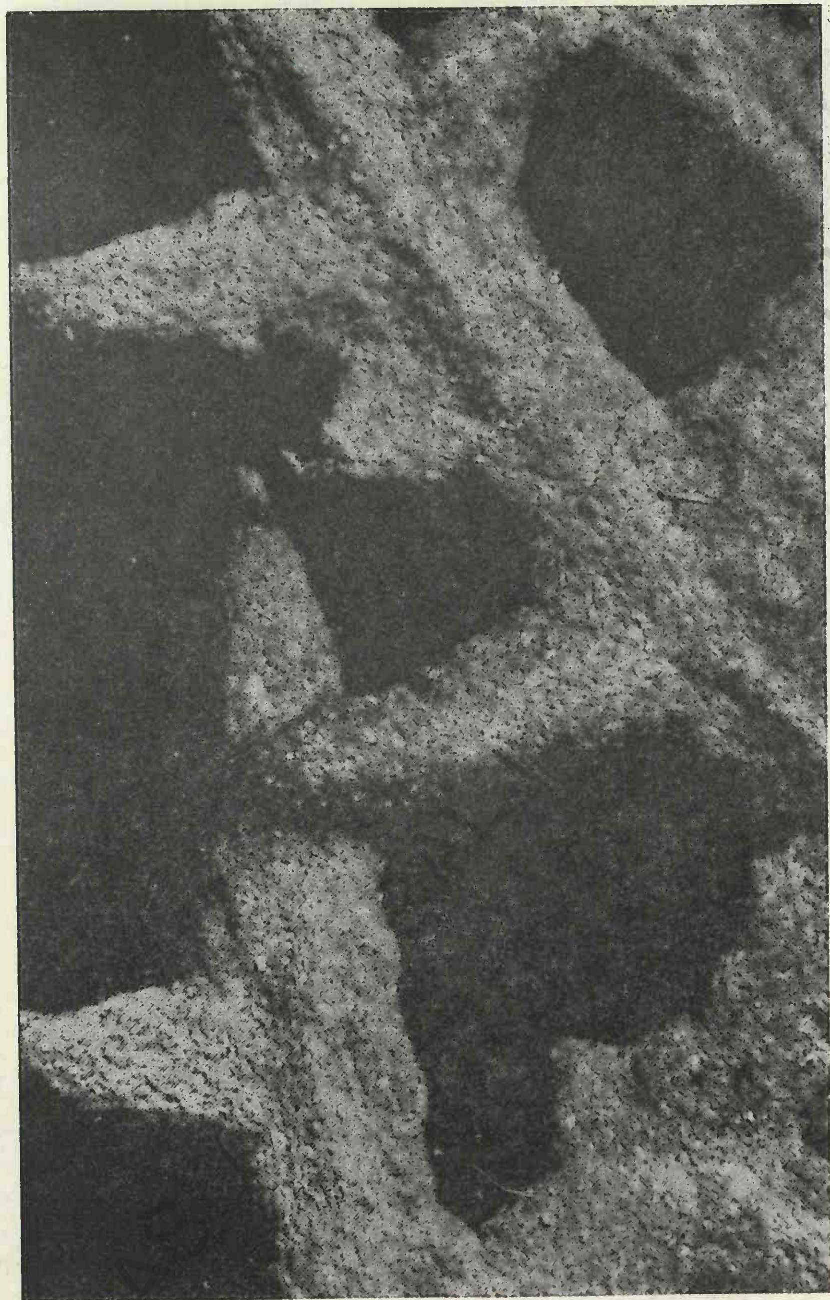




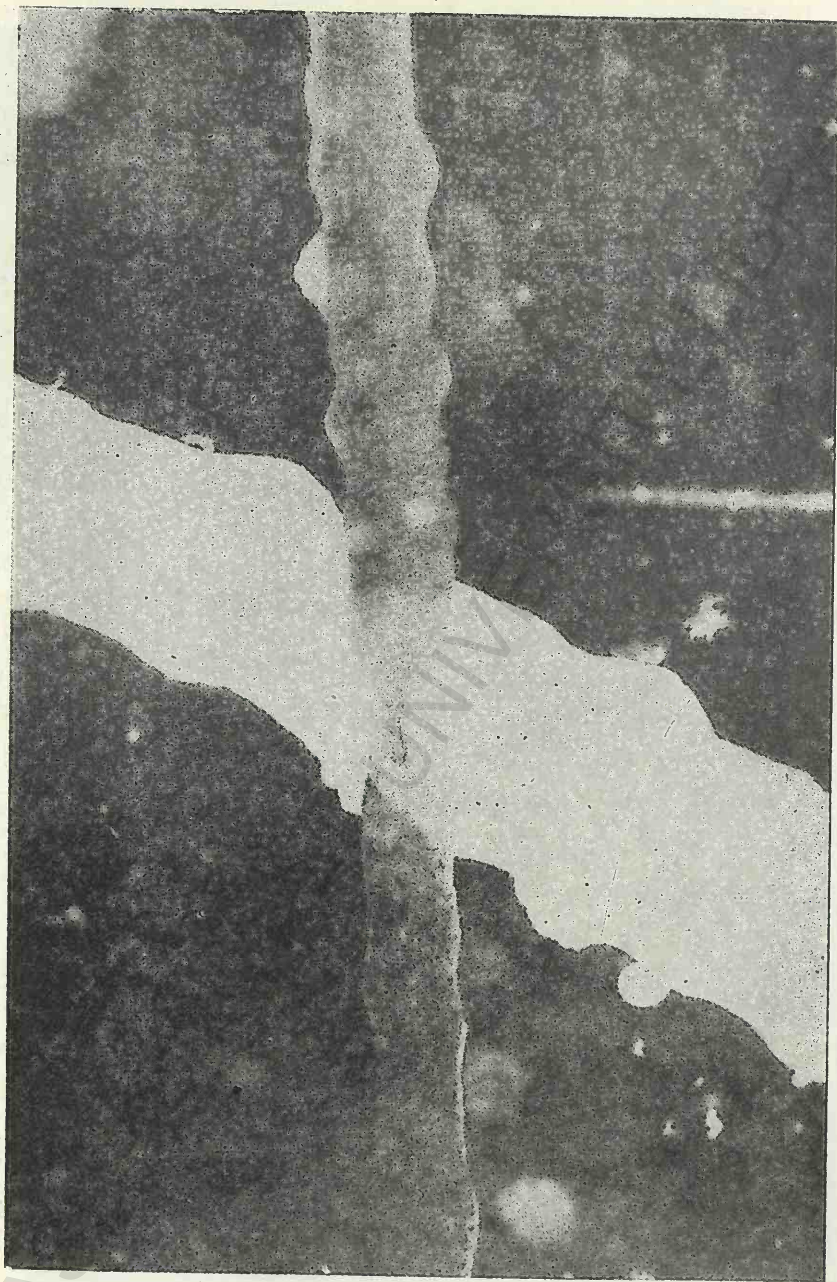
Pl. 29 — Microelectronografia membranei unor hematii de oaie (A) şi de om (B), evidenţiind leziunile membranare induse de complement (după Dias da Silva, 1986).



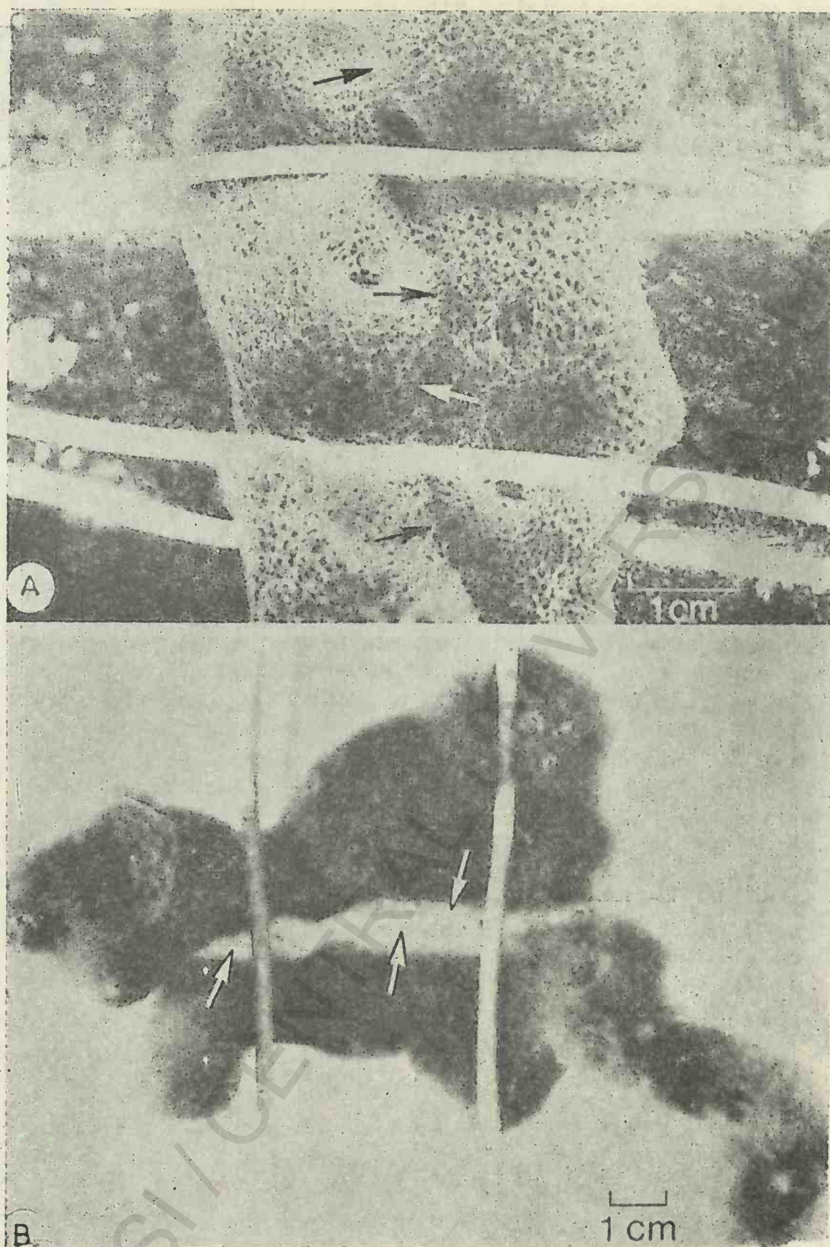
Pl. 30 — Aspectul leziunilor induse de complement. **A.** Hematii de berbec lizate de complementul uman. La stînga liniei, aspectul membranei îndepărtată prin proteoliză. Complexele cilindrice C5b—9(n) sînt vizibile în proiecţie laterală de-a lungul marginii membranei şi în proiecţie axială pe membrană (↓). **B.** Liposomi care au încorporat complexele C5b-9(n) (↓). Complexul cilindric depăşeşte cu ~ 10 nm membrana liposomală. **C.** Complexe C5b-9(n) izolate într-o soluţie de detergent. Cilindrii izolaţi au o înălţime de 15 nm. Barele au 50 nm (microelectronografii după Tranum — Jensen şi Bhakdi, 1978). **D.** Rozetă de celule T produsă prin incubarea celulelor T cu hematii de oaie, urmată de menţinerea la rece pentru rozetare (după Good, 1977).



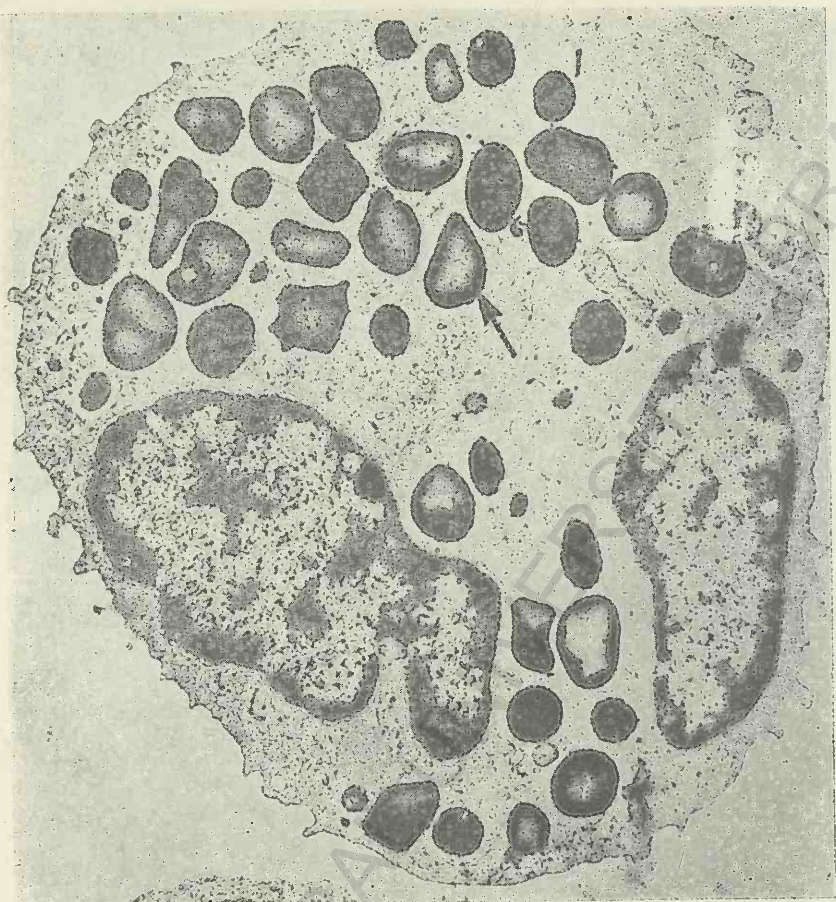
Pl. 31 — Fuziuni între ramurile unei gorgone din genul *Gorgonia*, constituind o autogrefă naturală. Fenomenul face parte dintr-un proces morfogenetic normal, ce dă acestor animale un aspect reticulat (după Lecomte, 1976).



Pl. 32 – Respingerea grefei unei ramuri de gorgonă roşie (ţesut-ţintă) de către o ramură de gorgonă albă (ţesut-killer), cu care a fost pusă în contact (după Bussard, 1972).



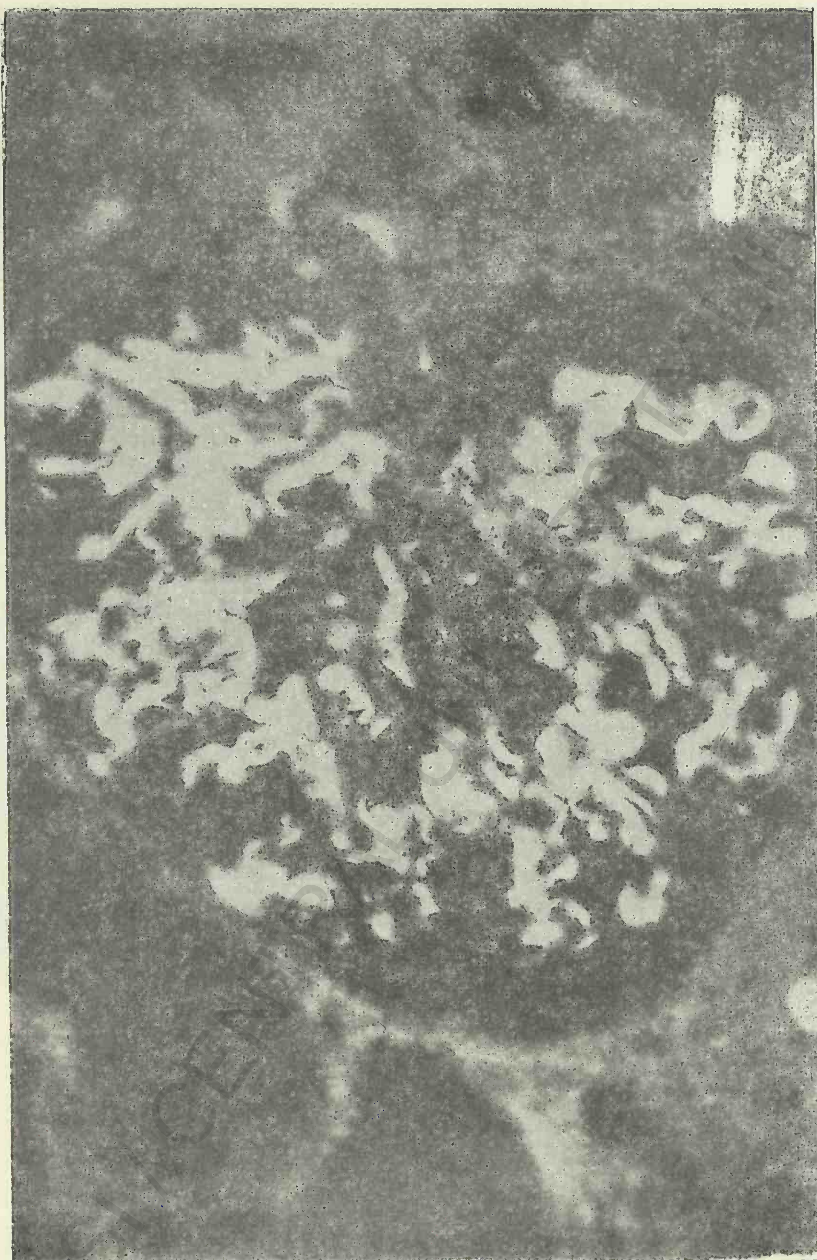
Pl. 33. — Reacţii parabiotice între prelungirile intacte de la *Callyspongia* menţinute în contact, printr-un cablu acoperit cu material plastic, pe plăci de plexiglas. A. Fuziune interfacială determinată de compatibilitatea dintre parabionţi singenici, după 2 — 3 zile de contact. B. Citotoxicitatea bilaterală determinată de incompatibilitatea dintre parabionţi alogenici, evidenţiind reţeaua scheletului (↓), după necroza ţesuturilor moi, la 7 — 9 zile de contact (după Hildermann, Johnson şi Jokiel, 1978).



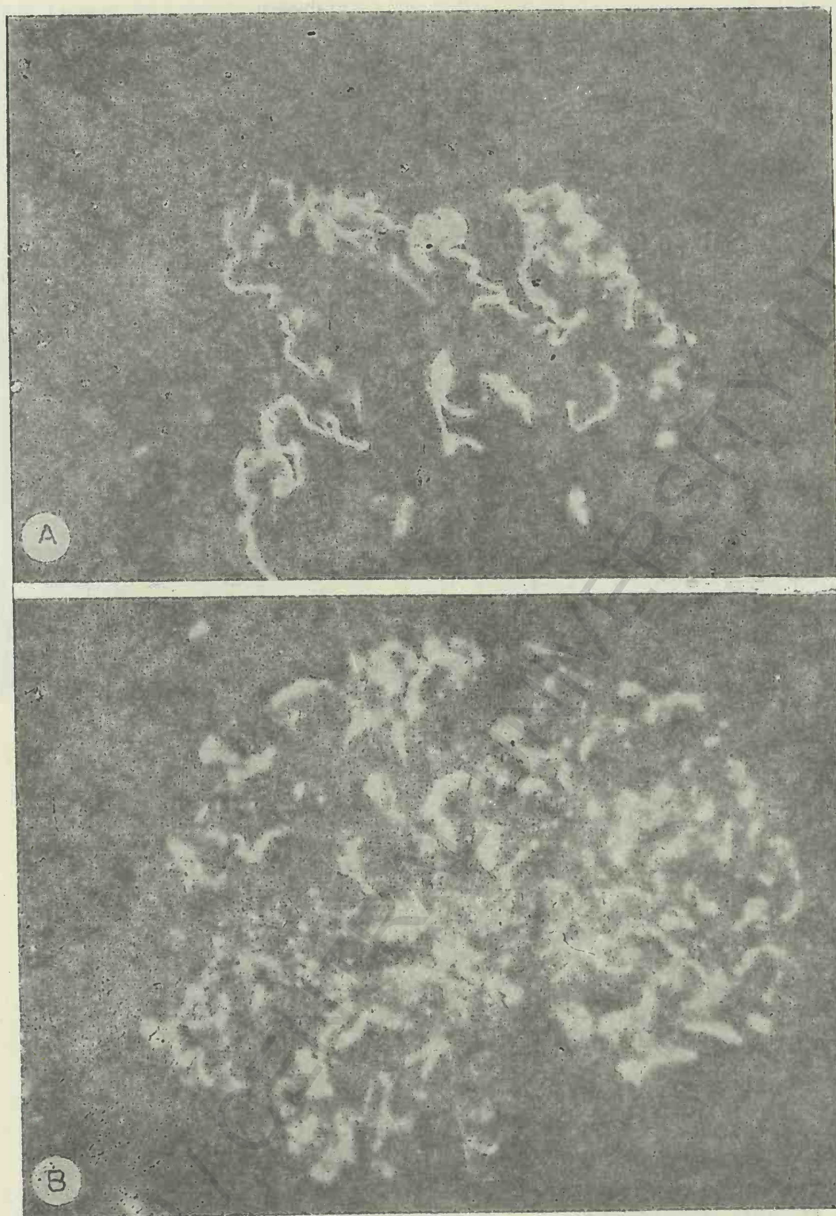
Pl. 34 — Eozinofil uman normal provenit din măduva oaselor. Granulaţiile sînt evidenţiate cu ajutorul reacţiei peroxidazelor, al căror produs este prezent în structura lor, cu excepţia structurilor cristaline (↓), care apar evidente pe fondul negru al granulaţiilor (microelectronografie, după Bainton, 1980).



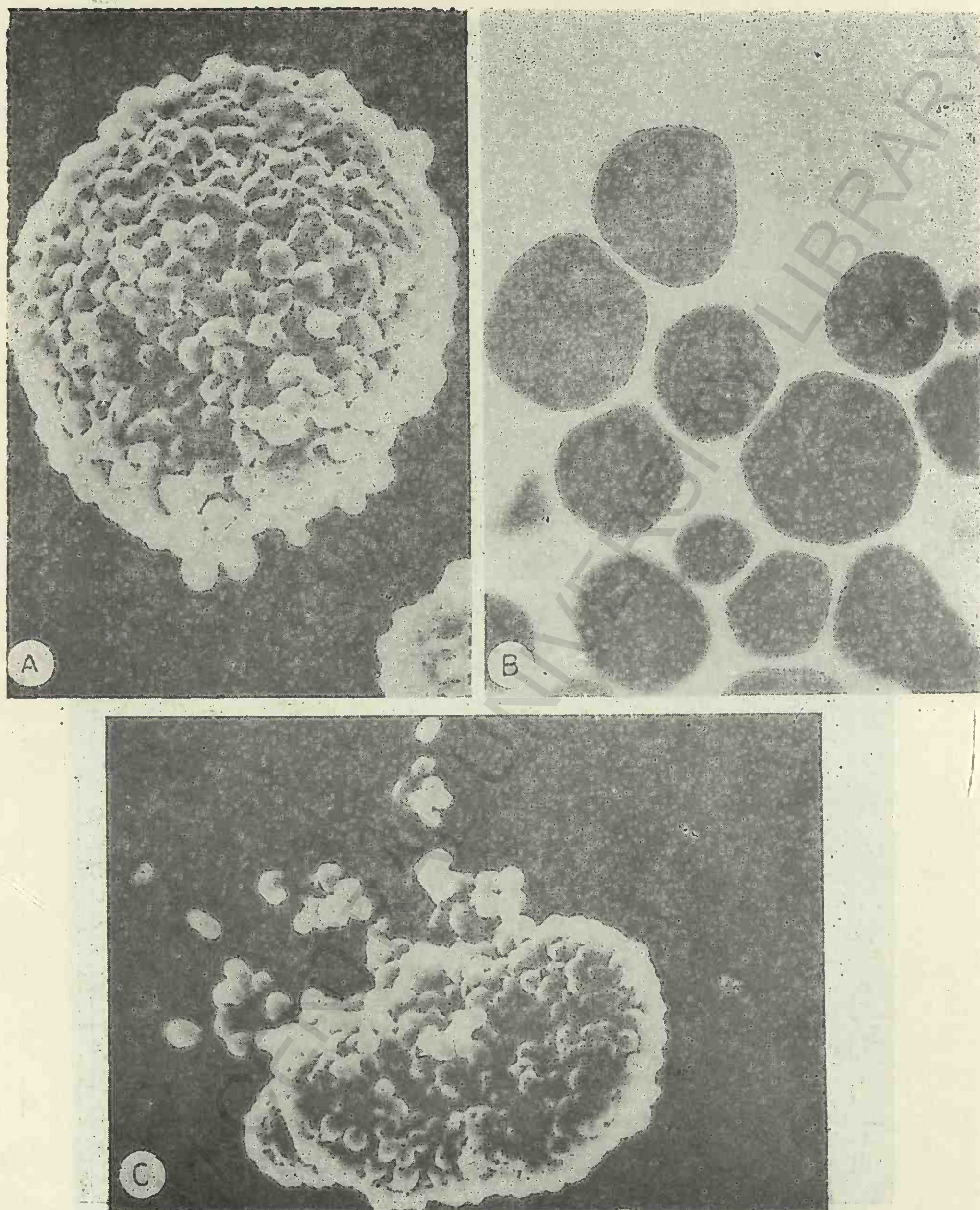
Pl. 35 — Bazofil uman matur din sînge. Microelectronografia evidențiază nucleul mare (n), particulele de glicogen (gl) și granulațiile cu aspect electrondens, datorită produșilor reacției pentru peroxidaze (după Bainton, 1980).



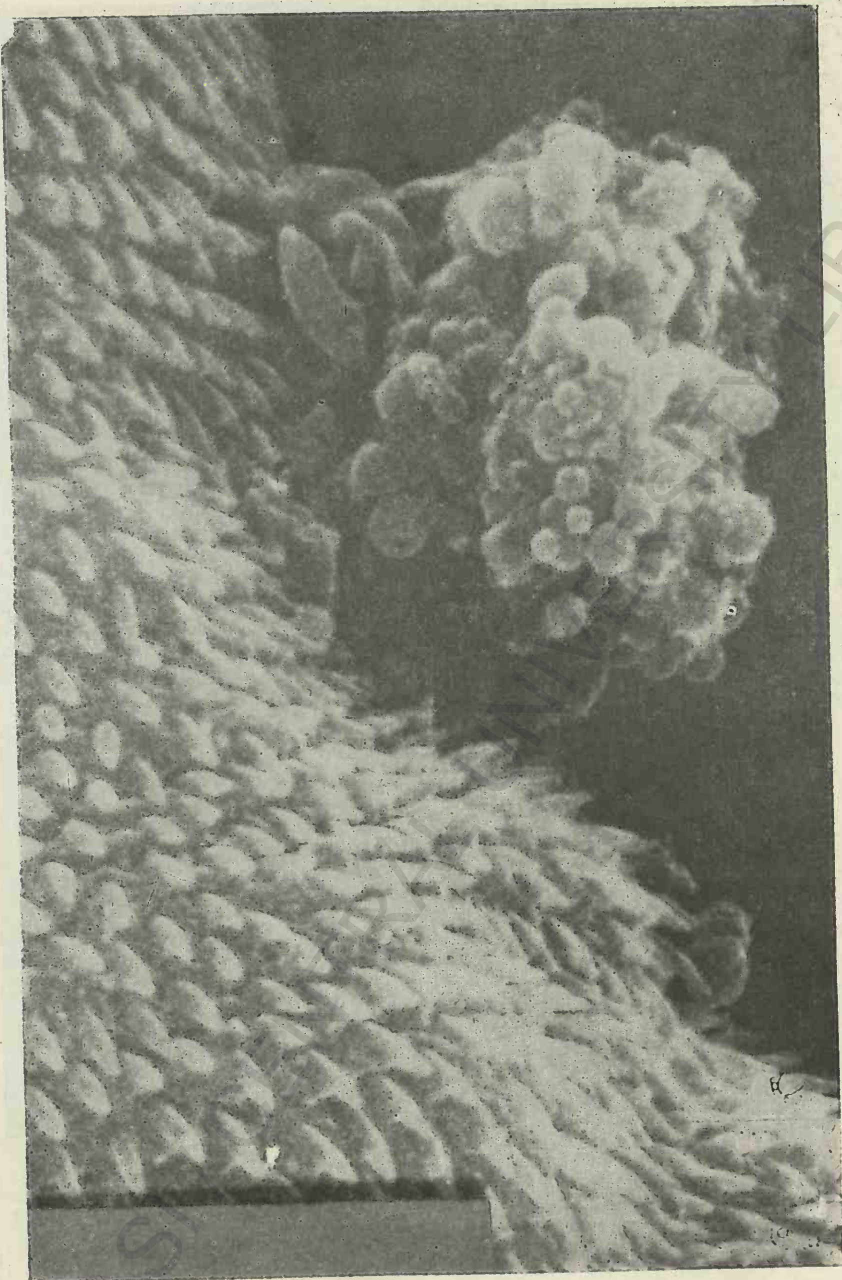
Pl. 36 — Aspectul depozitelor de imunoglobuline la nivelul unui glomerul renal, după o grefă alogenică. Evidențierea s-a realizat cu ajutorul unui ser imun anti-Ig fluorescent (după Hamburger, 1973).



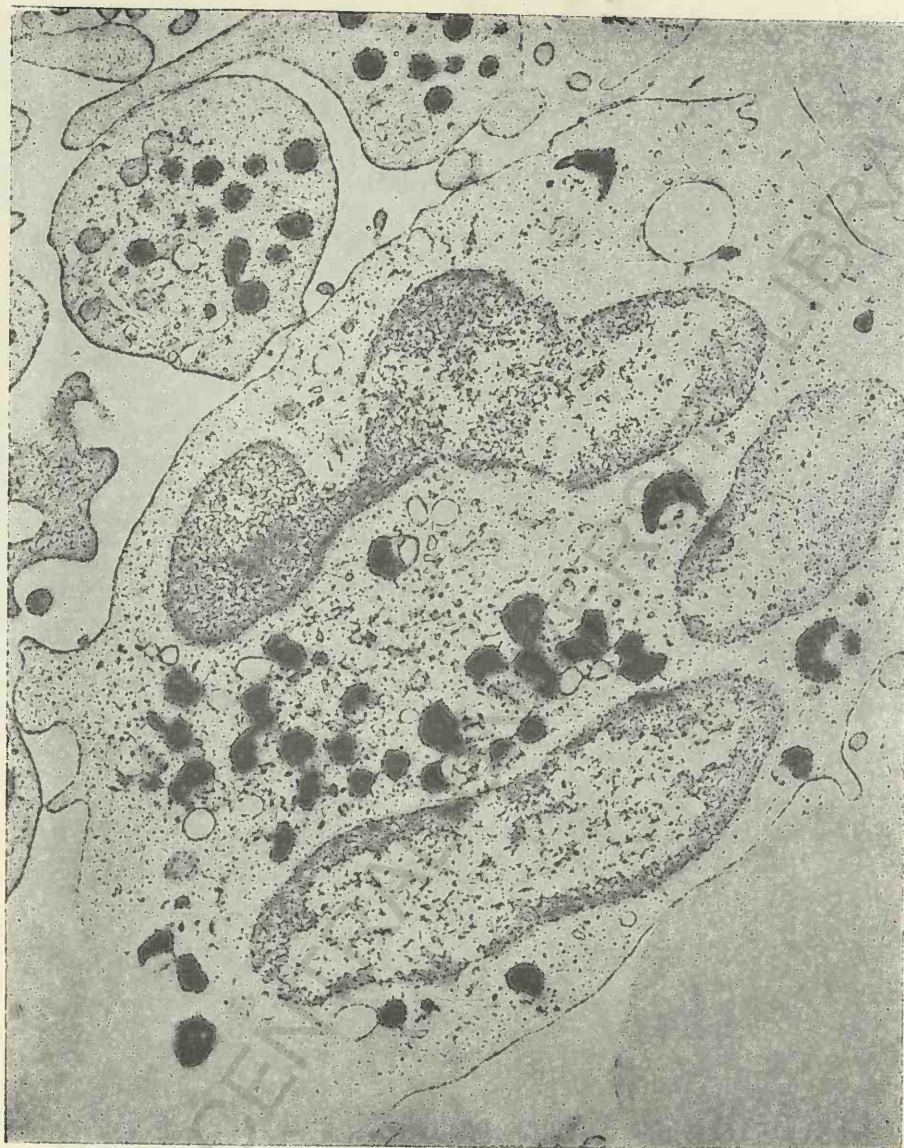
Pl. 37 — Analiza prin imunofluorescență a unei biopsii renale. **A**: depozite lineare continue de IgG, de-a lungul membranei bazale glomerulare. **B**: depozite difuze neregulate de Ig în glomerulii unui bolnav cu glomerulonefrită mediată de complexe imune (după Norberg, 1985).



Pl. 38 — Mastocite peritoneale de la şobolan. Microelectronografiile unei celule nedegranulate (A), a unor granule (B) şi a unui mastocit în curs de exocitoză a granulelor, după incubarea la 37°C, 30 secunde, cu ser anti-IgE (C) (după Orr şi Brostoff, 1987).



Pl. 39 — Eozinofil uman (↓) aderent pe suprafaţa unei larve de *Schistosoma*, care a fost în prealabil „acoperită" cu anticorpi proveniţi de la bolnavi de schistosomiază. Membrana celulară ruptă permite răspîndirea granulaţiilor (după Cauldfield, 1987).



Pl. 40 — Bazofil cu nucleu plurilobulat, înconjurat de plachete sanguine normale. Microelectronografie pe secţiuni ultrafine (după Hüben, 1978).

înrudite. De aici, caracterul de activare supusă restricției CMH („Cognate stimulation"; engl. „cognate", asemănător ca origine, natură, calitate, descinzînd dintr-un strămoș comun).

Mecanismele moleculare ale interacțiunii directe T—B nu sînt cunoscute. Pe baza cunoștințelor actuale au fost elaborate mai multe modele, în general, plauzibile.

Modelul interacțiunii a două celule. Deși, teoretic, interacțiunile celulare ce declanșează răspunsul imun umoral implică participarea a trei celule (macrofagele care prezintă antigenul, celulele T și B), Schwartz (1984) prezintă un model simplu de activare, bazat pe interacțiunea directă dintre celulele T și B. El se bazează pe datele lui Cohn și Epstein (1978), care au arătat că limfocitele T_H care interacționează direct cu celulele B, într-un mod bazat pe restricția CMH, eliberează semnale „helper" prin intermediul moleculelor CMH din clasa II. Modelul propus este valabil atît pentru interacțiunea T_H — B, cît și pentru cea dintre macrofage (CPA) și celulele T (fig. 152).

În acest model, antigenul servește ca o punte, care menține celulele T_H în contact direct cu celulele B, riguros corespunzătoare. Moleculele din clasa II CMH, prezente atît pe celulele B, cît și pe CPA, sînt implicate în transmiterea semnalului între celule și în acceptarea lui. Participarea receptorilor respectivi (T și B) fixează antigenele în așa fel încît semnalele

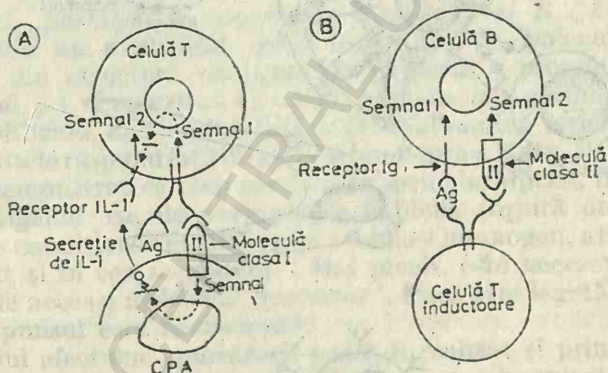


Fig. 152. — Rolul moleculelor din clasa II CMH în activarea celulelor T și B. Figura prezintă interacțiunea dintre o celulă T inductoare și un limfocit B și respectiv interacțiunea dintre o celulă care „prezintă" antigenul și un limfocit (după Schwartz, 1984).

inductoare sînt eliberate direct celulei B. Cele două celule, T și B, care interacționează sînt menținute strîns asociate datorită afinității receptorului T pentru determinanții antigenici ai moleculei „purtător", precum și a receptorilor Ig de pe celulele B pentru haptenă*.

---

* Dacă antigenul are o structură unică (lipsită de determinanți repetitivi pe suprafață), în mod obligatoriu, receptorul celulei T va recunoaște determinanți diferiți de cei recunoscuți de celula B.

Modelul implică intervenția a două semnale: 1) primul, reprezentat de legarea antigenului de receptorul Ig al celulei B; 2) al doilea, declanșat de recunoașterea antigenului asociat cu moleculele CMH de pe suprafața celulelor B, de către celulele T_H. Final, interacțiunea T_H — B declanșează producerea de limfokine (BCGF și BCDF), care, acționînd pe celulele B, activează cascada răspunsului imun ce determină producerea de anticorpi.

Modelul interacțiunii a trei celule se bazează pe necesitatea interacțiunii dintre celulele care prezintă antigenele (CPA) cu celulele T și B, impusă de antigenele multivalente (fig. 153). Procesul este mai complex și ar evolua, după Schwartz (1984), în următoarele faze:

1) Evenimentul inițial este reprezentat de recunoașterea antigenului și a moleculelor CMH din clasa II, de pe suprafața macrofagului stimulat de antigen, de către celulele T_H, prin intermediul receptorului T (fig. 154).

2) Fenomenul determină două evenimente noi: a) transducția unui semnal în macrofag, pe calea moleculelor CMH din clasa II, urmată de producerea și/sau eliberarea de factori (în special interleukină-1), care activează celulele T: b) transducția unui semnal în celula T_H, pe

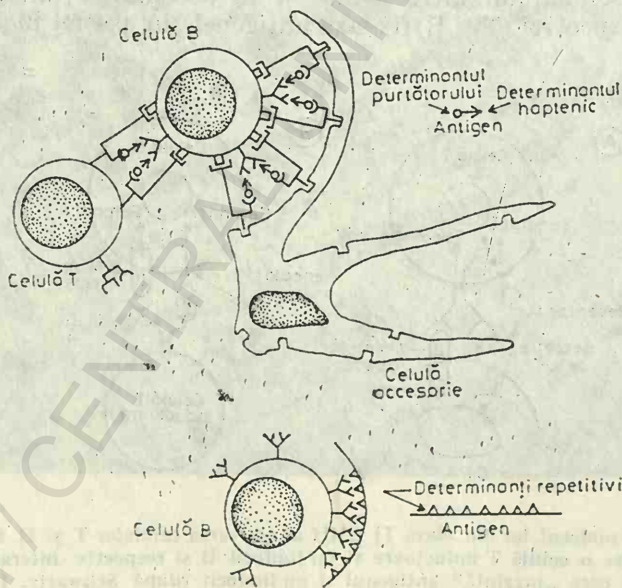


Fig. 153. — Reprezentare schematică a interacțiunilor celulare în răspunsul imun. A. În răspunsul T-dependent, celulele accesorii și T sînt necesare pentru a prezenta antigenele monovalente receptorilor de pe celulele B, sub forma unei serii multivalente. B. Antigenele multivalente pot activa celulele B independent de celulele T (după Hood și colab., 1984).

calea receptorului T, care o face receptivă la IL-1 (prin exprimarea receptorilor de IL-1) sau care acționează sinergic cu IL-1, pentru a activa celula T_H.

3) După activare, celulele T_H transmit semnale activatoare (efectul „helper") celulelor B cu fenotipul Ly−b5⁻.Fenomenul are loc prin interacţiunea celulelor T_H cu antigenul, legat de receptorii imunoglobulinici, şi cu moleculele CMH din clasa II, de pe suprafaţa celulelor B. În acelaşi timp, celulele T_H secretă şi limfokine.

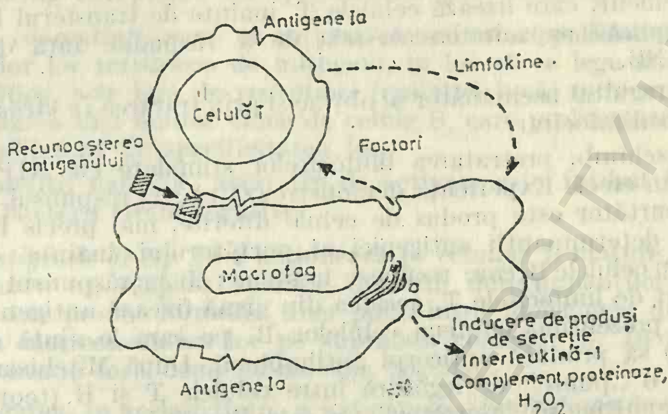


Fig. 154. — Reprezentare schematică a interacţiunii dintre un macrofag şi o celulă T dependentă de produşii (antigenele Ia) genelor CMH. Recunoaşterea este urmată de producerea de mediatori de către ambele celule (după Webb, 1984).

Efectul „purtător" în cooperarea celulelor T şi B. O serie de date experimentale au evidenţiat rolul important al moleculei „purtător" („carrier") din structura conjugatelor haptenă — proteină în răspunsul imun. Astfel s-a demonstrat că unele animale nu produc anticorpi faţă de DNP-polilizină, dar produc faţă de DNP-albumină serică bovină (ASB), în timp ce altele răspund faţă de ambele imunogene. Katz, Paul şi Benacerraf (1970) au demonstrat că răspunsul imun secundar optim, faţă de un determinant antigenic ca, de exemplu, o haptenă (lipsită de imunogenitate *per se*), este condiţionat de utilizarea aceluiaşi imunogen, atît în imunizarea primară, cît şi în cea secundară. Mai precis, este necesar ca haptena să fie legată de aceeaşi moleculă „purtător". Dacă este legată de un purtător diferit, răspunsul este neînsemnat.

Studiul efectului „purtător" poate fi realizat şi prin *tehnica transferului adoptiv*. Mitchison (1971) a utilizat şoareci imunizaţi cu complexul haptenă — purtător NIP — OVA, în care haptena NIP este acidul 4-hidroxi, 3-iodo, 5-nitrofenil acetic, iar OVA, ovalbumina de găină. Dacă celulele splenice de la şoarecii imunizaţi sînt transferate la şoarecii singenici iradiaţi intens (pentru ca majoritatea limfocitelor proprii să fie distruse), organismele receptoare nu produc anticorpi decît dacă sînt reinjectate cu haptena NIP, legată de acelaşi purtător (OVA). Injectarea complexului NIP — ASB este fără efect.

Producerea anticorpilor anti-NIP este posibilă, dacă după injectarea complexului NIP — ASB se transferă simultan animalelor respective, celulele splenice provenite de la animalele imunizate cu NIP — OVA şi de la şoareci imunizaţi numai cu ASB (fără NIP). Celulele sensi-

bilizate prin imunizare cu ASB (albumină serică bovină) nu pot fi înlocuite cu anticorpi anti-ASB. Utilizîndu-se un marker alotipic, s-a demonstrat că anticorpii anti-NIP erau secretați de celulele provenite de la șoarecele imunizat cu NIP — OVA. Experiența sugerează participarea unor celule diferite în răspunsul imun descris, fapt confirmat de o experiență de control. Pretratarea limfocitelor stimulate cu ASB, ser anti-Lyt-1 și complement, care lizează celulele T înainte de transferul la gazda iradiată, suprimă capacitatea acesteia de a răspunde față de complexul NIP — ASB.

Un rezultat asemănător se obține și prin tratarea *in vivo* a donatorilor cu ser antilimfocitar.

În schimb, pretratarea limfocitelor stimulate cu NIP — OVA nu are nici un efect. Experiența demonstrează că : 1) răspunsul față de haptenă și purtător este produs de celule diferite, mai precis limfocitele T recunosc determinanții antigenici ai purtătorului înainte de a interacționa cu celulele B, care recunosc haptena ; 2) în răspunsul celulelor B, dependent de limfocitele T, acestea din urmă fixează antigenul pe suprafața lor, prezentînd haptena celulelor B, pe care le ajută astfel (efect „helper") să producă anticorpi antihaptenă. După Mitchison, antigenul ar forma o „punte" de legătură între celulele T și B (teoria „punții" antigenice). Efectul „purtător" nu este limitat la complexele haptenă-purtător, ci, probabil, are un caracter general. El demonstrează că interacțiunea T — B, de care depinde expansiunea clonei de celule B și producerea de anticorpi antihaptenă, implică două semnale : 1) interacțiunea celulelor B cu antigenul fixat de receptorii imunoglobulinici de pe suprafața lor și 2) intervenția celulelor T_H, care au recunoscut antigenul prin receptorii proprii de antigen (Ti/T3) înainte de a-și exercita efectul „helper" față de celulele B. Componentul „purtător" din structura antigenelor, fără să contribuie la specificitatea răspunsului, are rol important în determinarea biosintezei și a naturii anticorpilor formați.

Descoperirea efectului „purtător" are o importanță deosebită, deoarece a determinat elaborarea modelelor de interacțiune între celulele T și B.

Activarea celulelor B independentă de limfocitele T. Răspunsul timoindependent

Unele antigene (polizaharide, flagelina polimerizată, polivinil-pirolidona etc.) stimulează celulele B, fără ajutorul limfocitelor T. Ca urmare, ele determină același răspuns în anticorpi atît la șoarecii normali, cît și la cei atimici. Nu se știe dacă această comportare este determinată, în mod exclusiv, de proprietățile lor : molecule mari, polimerice, cu structură monotonă, cu determinanți identici, legați în serie, sub formă de unități repetitive, cu activitate (în doze mari) mitogenă *in vitro*, greu degradabile și în consecință foarte persistente în organism (Mitchell, 1975). Au fost descrise două tipuri de antigene de acest tip (timoindependente, TI), care acționează asupra unor subpopulații diferite de celule B.

1) *Antigenele de tip TI-1* ar acționa asupra celulelor B mai puțin diferențiate și ar putea produce două tipuri de răspuns imun:

a) *în concentrații mici* ar determina o activare specifică, selectivă, datorită concentrării antigenului pe suprafața celulelor B, care poartă molecule de Ig receptoare cu specificitate pentru antigenul respectiv;

b) *în concentrații mari* ar acționa ca activatori policlonali. Datorită proprietăților lor intrinsece de mitogeni, în loc să se lege de moleculele de Ig specifice, s-ar lega de receptorii (ipotetici încă) mitogeni, determinînd stimularea mai multor clone de celule B, care proliferează și se diferențiază indiferent de specificitatea lor.

În condiții naturale, acest tip de activare este întîlnit în infecțiile masive cu bacterii Gram-negative.

2) *Antigenele de tip TI-2* acționează pe celulele B mature. Ele determină exclusiv un răspuns specific datorită determinanților antigenici repetitivi, care produc formarea unor punți între moleculele de Ig-receptoare, prin interconectarea lor pe suprafața celulelor B. În ultimii ani au fost avansate încă două mecanisme posibile:

a) legarea, în același timp, a antigenelor timoindependente de moleculele de Ig, pe de o parte, și de receptorii ipotetici de mitogeni, pe de alta. Moleculele de Ig ar furniza un element de specificitate și ar focaliza receptorii de mitogeni pe suprafața celulelor B. La rîndul lor, aceștia ar furniza cel de-al doilea semnal de activare;

b) antigenele TI ar putea acționa activînd sistemul complement fie pe calea clasică, fie pe cea alternativă. Componenții activi ai acestuia s-ar lega de receptorii corespunzători de pe celulele B, furnizînd cel de-al doilea semnal de activare.

Antigenele TI stimulează, în special, sinteza de IgM (la șoarece și formarea de IgG3). Ele nu determină sinteza de IgG și nici de celule cu memorie, ca în cazul răspunsului imun mediat de celulele T. Mecanismul acestei comportări este necunoscut. Au fost emise trei ipoteze: 1) producerea de IgM s-ar face pornind de la celule BIgM$^+$ sau BIgM$^+$/BIgD$^+$ virgine. Este posibil ca stimularea acestora să fie relativ independentă de celulele T și să nu producă memorie imunologică; 2) antigenele TI ar putea avea efect supresor asupra formării de IgG și de celule cu memorie; 3) efectul antigenelor TI ar fi, în special, mitogenic și s-ar exercita asupra anumitor populații de celule B.

Deși, în general, se consideră că activarea produsă de antigenele TI nu necesită prezența macrofagelor, date mai recente pledează pentru intervenția obligatorie a acestora, cel puțin în unele cazuri, prin intermediul unor factori activatori solubili.

Rolul CMH în restricția interacțiunilor celulare în cursul răspunsului imun. Modelele prezentate demonstrează cu evidență că cele mai multe celule T recunosc antigenele numai în asociere cu produșii genelor CMH.

Fig. 155 sintetizează rolul restricției CMH în interacțiunile celulare care generează răspunsul imun. Ele au la bază următoarele premise :

1) Celulele T posedă receptori cu specificitate dublă, pentru antigene și pentru o moleculă CMH de pe suprafața celulelor cu care interacționează.

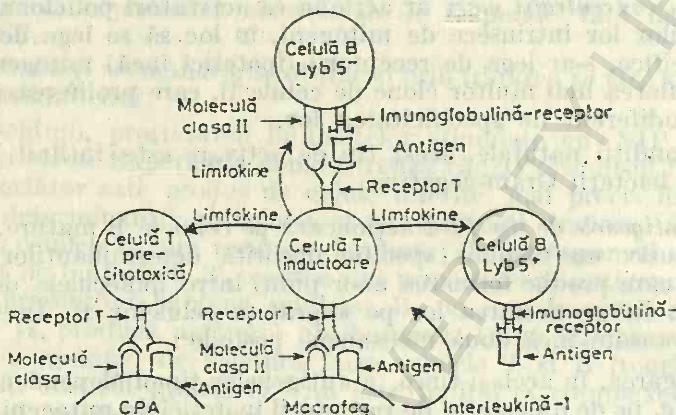


Fig. 155. — Reprezentare schematică a interacțiunilor celulare supuse restricției CMH, în cursul răspunsului imun. Modelul implică participarea macrofagelor, a celulelor care prezintă antigenele în general, a limfocitelor T_C inductoare, pre-T_C și a celor două tipuri de limfocite B (Lyb-5⁻ și Lyb-5⁺) (după Schwartz, 1984).

2) Pentru a activa celulele T inductoare, macrofagul prezintă pe suprafața sa atît antigenul, cît și o moleculă din clasa II CMH.

3) Odată activată, celula T transmite semnale stimulatoare („helper") unei celule B. În acest scop, celula T interacționează cu antigenul legat pe suprafața celulei B, prin receptorul ei imuno-globulinic (IgM și /sau IgD) și cu o moleculă CMH din clasa II.

4) Unele subpopulații de celule B nu necesită contact direct cu celulele T și pot fi activate nerestrictiv numai de antigen și de limfokinele produse de celulele T_H.

5) Celulele T_C se leagă de celule-țintă prin intermediul antigenului și al moleculelor CMH din clasa I prezente pe suprafața acestora. Ele sînt activate cînd întîlnesc aceste molecule în prezența limfokinelor.

6) În cursul activării celulelor T_C, celulele care prezintă antigenele (echivalente macrofagelor) pot fi foarte diferite, deoarece orice celulă nucleată, care poartă pe suprafață molecule CMH din clasa I, în asociere cu antigene virale, tumorale etc., poate deveni „ținta" efectului citotoxic.

Celulele T_H supuse restricției CMH sînt denumite celule T_H—CMH

În ultimii ani a fost semnalată o categorie de celule T_H care nu este supusă restricției CMH. Ele pot stimula și activa numai celulele B mature care exprimă anumite izotipuri, alotipuri sau idiotipuri de Ig. Aceste celule au fost denumite T_H—Ig, pentru a indica restricția acțiunii lor

determinată de Ig şi independentă faţă de restricţia CMH. Numeroase date arată că uneori stimularea selectivă a celulelor B necesită acţiunea simultană a mai multor tipuri de celule T_H (fig. 156).

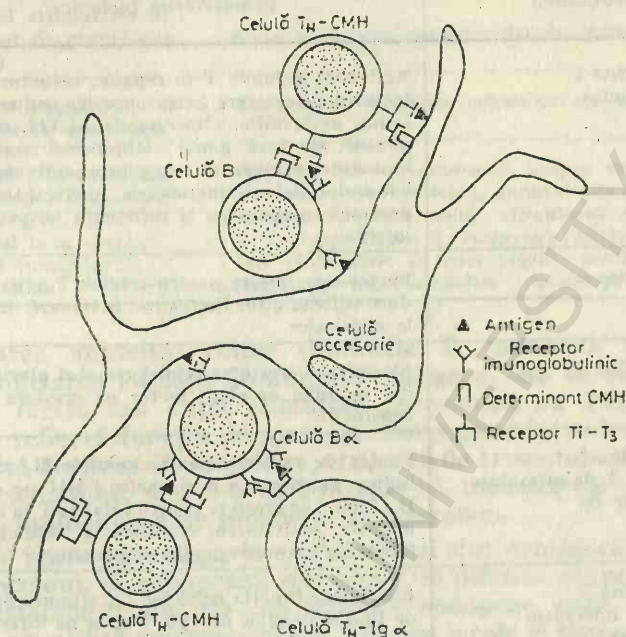


Fig. 156. — Stimularea celulelor B mature de către limfocitele T_H efectoare. În regiunea superioară este prezentată o asociere de trei celule, necesară pentru stimularea tuturor claselor de celule B. În regiunea inferioară este prezentată o asociere de patru celule necesară pentru stimularea celulelor B specifice (în acest caz Bα) (după Hood şi colab., 1984).

Mediatorii moleculari ai răspunsului imun. Interleukinele şi interferonii

Celulele sistemului imunitar schimbă permanent diferite semnale cu rol esenţial în interacţiunile cooperante necesare unui răspuns imun eficient. Unele semnale sînt asociate cu contacte intercelulare directe, în timp ce altele sînt efectuate prin intermediul unor mesageri chimici, care influenţează funcţia leucocitelor în general.

Interleukinele

Interleukinele (IL) sînt mediatori biologic activi, de natură proteică, capabili să transmită celulelor imunocompetente semnalele necesare pentru activarea, proliferarea şi diferenţierea lor la celule efectoare helper, citotoxice, producătoare de anticorpi etc. (tabelul nr. 44). Sînt elaborate

Tabelul nr. 44

Proprietățile biologice ale principalelor limfokine

Denumirea	Proprietățile biologice
Interleukina-1 (alfa și beta)	Activează celulele T în repaus; cofactor pentru factorul de creștere hematopoetic; induce febră, somn, neutrofilie, eliberare de ACTH, alte răspunsuri de fază acută; stimulează sinteza de limfokine, colagen și colagenaze; activează celulele endoteliale și macrofagele; mediază inflamația, procesele metabolice și rezistența nespecifică la infecție.
Interleukina-2	Factor de creștere pentru celulele T activate; induce sinteza altor limfokine; activează limfocitele citotoxice.
Interleukina-3	Stimulează creșterea celulelor-matcă pluripotente din măduva oaselor; factor de creștere pentru mastocite.
Interleukina-4 (Factorul 1 de stimulare a celulelor B)	Factor de creștere pentru celulele B activate; induce exprimarea antigenelor CMH pe celulele B; factor de creștere pentru celulele T în repaus; mărește activitatea citolitică a celulelor T; factor de creștere pentru mastocite.
Interleukina-5 (Factorul înlocuitor al celulelor T; factorul de diferențiere a eozinofilelor)	Înlocuiește funcția celulelor T_H, stimulînd sinteza de IgM și ulterior de IgG. Factor de diferențiere a eozinofilelor.
Interleukina-6 (Factorul 2 stimulator al celulelor B; IFN-γ2; factorul stimulator al hepatocitelor)	Stimulează celulele B și hepatocitele
Factorul de stimulare a diferențierii celulelor B (BCDF)	Induce diferențierea celulelor B activate la plasmocite. Identic cu INF-β_2, cu factorul de creștere al plasmocitului și cu factorul stimulator al hepatocitului.
Interferonii gama	Induc formarea antigenelor de suprafață CMH cl. I și II și a altora pe suprafața a diferite celule; activează macrofagele și celulele endoteliale; măresc sau inhibă activitățile altor limfokine; măresc activitatea killer naturală; au activitate antivirală.
Interferonii alfa și beta	Activitate antivirală; induc exprimarea antigenelor cl. I CMH; măresc activitatea killer naturală; induc febră; proprietăți antiproliferative.
Factorul stimulator al coloniilor de granulocite-macrofage (GM–CSF)	Stimulează formarea coloniilor de neutrofile, eozinofile și macrofage medulare; activează granulocitele mature.

Tabelul nr. 44 (continuare)

Denumirea	Proprietățile biologice
Factorul stilmulator al coloniilor de granulocite (GCSF)	Stimulează formarea coloniilor de neutrofile.
Factorul stimulator al coloniilor de macrofage	Stimulează formarea coloniilor de macrofage.
Factorul alfa necrozant al tumorilor (cașectina)	Acțiune directă citotoxică asupra unor celule tumorale; induce febră, somn și alte răspunsuri sistemice de fază acută; stimulează sinteza de limfokine, colagen și colagenaze; activează celulele endoteliale și macrofagele; mediază inflamația, procesele catabolice și șocul septic.
Factorul beta necrozant al tumorilor (limfotoxina)	

prin activarea anumitor celule (limfocite T, monocite și macrofage), după sensibilizarea lor față de anumite antigene, sau *in vitro*, în culturi limfocitare mixte sau după stimulare nespecifică cu PHA sau ConA. Denumirea reflectă funcția de mesageri moleculari între leucocite și este mai potrivită decît cea de *limfokine*, atribuită de Dumonde și colab. (1969), folosită încă curent, deși s-a demonstrat că monokinele (IL-1) nu sînt produse de limfocite, ci de monocite și macrofage.

IL fac parte din categoria citokinelor și sînt considerate, în prezent, ca imunohormoni, ce acționează secvențial, în diferite etape ale cooperării celulelor sistemului imunitar, ca semnale endogene care, împreună cu antigenele, amplifică mecanismele de apărare locale și sistemice ale gazdei față de agresiuni externe. Evidențierea activității IL se face prin demonstrarea capacității supernatantului unei culturi de limfocite purificate de a elabora, în prezența unor produse stimulatoare ca PHA (ce mimează o agresiune antigenică externă), substanțe care induc proliferarea celulelor T sau B (fig. 157).

Izolarea și caracterizarea lor este foarte dificilă, din cauze multiple: 1) sînt prezente în organism în cantități extrem de mici; 2) unele formează familii de molecule, cu oarecare grad de heterogenitate; 3) existența unor celule- „țintă" diferite; 4) lipsa unor tehnici sensibile de testare.

IL sînt active în doze foarte mici ($10^{-10} - 10^{-12}$ M). Ele sînt secretate paracrin și își exercită acțiunea în micromediul în care sînt produse, în special asupra celulelor învecinate, fie staționare, fie în trecere. Pot fi găsite în circulație numai în cantități foarte mici (Bocci, 1985). Aceste dificultăți sînt reflectate și în concepțiile privind relația dintre fenotipul celular, funcția (spre exemplu, citotoxică) și producerea anumitor IL. Unii cercetători resping ideea unei corelații de acest gen, în timp ce alții consideră că celulele T (manifestînd restricție CMH clasa I) produc în special MAF și INFγ, în timp ce celulele T_H supuse restricției CMH clasa II produc CSF și IL-2. Semnalul reprezentat de IL este prelucrat numai de celulele care exprimă receptori specifici pentru legarea lor. Receptorii apar numai pe celulele activate.

Nomenclatură. În general, denumirile limfokinelor s-au raportat la activitatea lor evidenţiată *in vitro*, fără a putea stabili o corelaţie strictă cu o anumită proteină factor activator, mitogen, stimulator, killer etc. Aceasta a făcut ca aceeaşi limfokină să fie descrisă sub diferite denumiri.

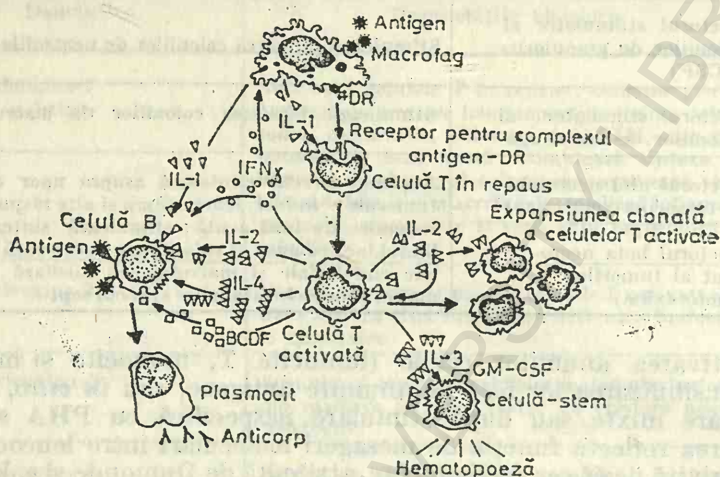


Fig. 157. — Rolul diferitelor limfokine produse după stimularea antigenică. Antigenul înglobat şi prelucrat de macrofage este prezentat celulei T în repaus, împreună cu molecula CMH (DR) şi IL-1. După activare, celula T produce interferon γ (IFNγ), IL-2, IL-3, IL-4 şi factorul de diferenţiere al celulelor B (BCDF). Antigenul activează şi limfocitele B legîndu-se de anticorpii de pe suprafaţa lor şi sub influenţa IFNγ, IL-1, IL-2, IL-4 şi BCDF evoluează spre stadiul de plasmocite care secretă anticorpi. Celulele T activate proliferează. Sub acţiunea IL-2 IL-3 şi factorului stimulator al coloniilor de granulocite şi macrofage (GM-CSF) produs de celulele T activate induc hematopoeza prin stimularea celulelor-stem din măduva oaselor (după Dinarello şi Mier, 1987).

Spre exemplu, recent s-a demonstrat că unul din factorii activatori ai macrofagelor este identic cu interferonul produs de limfocite. În prezent, singurii factori disponibili în stare pură sînt IL-2, IL-3, INFγ şi factorul stimulator al coloniilor.

Activităţile atribuite limfokinelor descrise pînă în prezent sînt următoarele:

1) *Mediatori cu funcţie de reglare a activităţii altor limfocite* (factori nespecifici pentru antigen): a) interleukina-2(IL-2)+; b) interleukina-3 (IL-3); c) interferonii α şi γ (IFN); d) supresorul solubil al răspunsului imun (SIRS); e) inhibitorul sintezei de ADN (IDS); f) factorul efector alogenic (AEF); g) factorul înlocuitor al celulelor T (TRF).

2) *Factori specifici de reglare ai altor limfocite pentru un antigen*: a) factorul helper specific T_HF; b) factorul specific supresor (T_SF).

3) *Inducerea inflamaţiei şi infiltrarea cu celule mononucleare*: factorul reactiv din piele (SRF).

+ În paranteze, acronimul principalei denumiri în limba engleză, utilizat pe plan internaţional.

4) *Modularea funcţiei celulelor fagocitare* : a) factorul inhibitor al migrării macrofagelor (MIF); b) factorul activator al macrofagelor (MAF); c) factorul inhibitor al migrării leucocitelor (LIF); d) factorul chemotactic (CF); e) interferonii α şi γ(IFN); e) factorul stimulator al coloniilor (CSF); f) factorul de fuzionare a macrofagelor (MFF).

5) *Reglarea altor ţesuturi* : a) factorul stimulator al coloniilor (CSF); b) factorul activator al osteoclastelor (OAF).

6) *Distrugerea celulelor-„ţintă" neleucocitare* : limfotoxinele heterogene (LT) (Roitt, Brostoff şi Malle, 1986), care pot liza celulele tumorale *in vitro*, dar al căror rol *in vivo* este necunoscut.

Deoarece cele mai multe limfokine au mai multe efecte biologice, la cel de-al 6-lea Congres Internaţional de Imunologie (1986) s-a hotărît ca moleculele nou descoperite să fie denumite după proprietatea lor biologică cea mai evidentă, urmînd ca, după stabilirea secvenţei aminoacizilor formei umane, să ia numărul corespunzător de interleukină. Spre exemplu, factorul 1 de stimulare a celulelor B umane a devenit IL-4.

Interleukina-1

Interleukina-1 (IL-1) a fost descrisă iniţial sub denumirea de *factor activator al limfocitelor* – LAF („Lymphocyte activator factor") (Gery, 1972) şi „redescoperită", în 1974, sub denumirea de *factor activator al celulelor B* (BAF). Prezenţa sa în culturile de celule sanguine periferice, de splenocite umane sau murine poate fi evidenţiată datorită capacităţii de a stimula producerea de anticorpi în absenţa celulelor T. Este produsă de monocite şi macrofage, de unde şi denumirea mai veche de *monokine*.

Au fost descrise două forme moleculare diferite de IL-1, notate α şi β, care au aceeaşi activitate biologică şi se leagă probabil de acelaşi receptor. Clonarea genelor respective în celula bacteriană determină producerea unei proteine care conţine ~ 270 de aminoacizi (g.m. 31 000 dal). Ea este clivată ulterior la molecule cu g.m. 18 000 dal (Dinarello, 1985). IL-1 umană cu această greutate are ca prim amino-acid pe cel cu numărul 117 (Auron, 1985). IL-1 rezistă la tripsină şi este sensibilă la pronază. Rezistă la −70°C şi la 56°C (March, 1984).

Producerea de IL-1, foarte redusă în cazul monocitelor circulante şi a macrofagelor în repaus, poate fi mult stimulată pe mai multe căi :

1) *Indirect, imunologic*, prin acţiunea celulelor T_H activate, prin contacte intercelulare supuse restricţiei CMH sau a altor limfokine, a interferonului γ şi a complexelor antigen–anticorp.

2) *Direct, nespecific*, cu ajutorul particulelor de siliciu, latexului, bacteriilor, muramildipeptidului, sărurilor de beriliu.

3) *Direct şi indirect* prin acţiunea lipopolizaharidelor, a ConA etc.

Natura agentului stimulator determină dacă IL-1 va fi eliberată în mediu sau acumulată în situsuri intracelulare. După Dinarello (1984), IL-1 nu este secretată în mediu, ci eliberată din macrofagele moarte în lupta cu infecţia. Unanue şi colab. (1985) consideră că IL-1 s-ar găsi sub două forme diferite : 1) *solubilă*, secretată sau eliberată după moartea

macrofagelor și 2) *legată* de membrana celulară, ca parte integrantă a acesteia. Cum macrofagele intră în contact direct și specific cu partenerii lor în inițierea răspunsului imun, ei consideră că IL-1 legată de membrane poate focaliza semnalul activator esențial exact pe acele celule imunitare care răspund la un anumit antigen străin. Mizel (1985) consideră că forma legată de membrane a IL-1 nu este cea a unui component membranar adevărat, ci este surprinsă în cursul eliberării sale din celulă.

Activitatea IL-1 este foarte complexă și se exercită asupra unei game largi de celule diferite, depășind cadrul sistemului imunitar. IL-1 este mai degrabă o citokină, decît o interleukină în sensul strict al termenului. Mecanismul de acțiune este necunoscut, fiind, probabil, corelat cu amplificarea procesului de transcriere a genelor respective la ARNm.

Au fost descrise două tipuri de funcții: imunitare și neimunitare. Activitatea imunitară se manifestă la concentrații foarte mici ($< 10^{-10}$ mol/L), frecvent la specii diferite de cea producătoare.

Principalele activități descrise sînt următoarele:

1) IL-1 mărește proliferarea, exprimarea IgMm și maturarea celulelor B, precum și anticorpogeneza, fie direct, fie indirect, prin intermediul celulelor T_H.

2) *Per se*, IL-1 nu poate induce proliferarea sau activarea limfocitelor derivate din timus. Ea furnizează un al doilea semnal, care, împreună cu primul, reprezentat de legarea antigenului în condiții de restricție CMH, induce apariția receptorilor de IL-2 și sinteza de IL-2, de factori chemotactici și de stimulatori ai coloniilor.

3) „Comandînd" sinteza de IL-2 (Shaw, 1980) de către celulele T_H, stimulează direct și indirect funcțiile celulelor T_C efectoare, mărește specific și nespecific efectele bactericide și tumoricide și intensifică activitatea celulelor NK, în special, pentru distrugerea celulelor metastazante în sînge.

4) Acționînd asupra mai multor tipuri de celule nelimfocitare, determină o intensificare a creșterii și activității lor funcționale, cu efecte pleiotrope, care includ acțiuni modulatoare asupra reacțiilor inflamatorii și efecte asupra rezistenței organismului. Astfel, IL-1 induce migrarea polimorfonuclearelor neutrofile din măduvă, mobilizarea lor chemotactică, eliberarea granulațiilor specifice, a lizozimului și a lactoferinei, creșterea metabolismului glucozei pe calea shunt-ului hexozomonofosfaților, producerea de superoxizi și de enzime intralizozomale etc.

5) Funcția de pirogen endogen s-ar realiza prin stimularea producerii de prostaglandină (PG) de către endoteliile vasculare din vecinătatea centrului febrei din hipotalamus, deoarece IL-1 nu depășește bariera hematoencefalică. Hipertermia produsă interferă cu replicarea virusurilor, cu creșterea bacteriilor și probabil a tumorilor.

6) IL-1 reglează răspunsul inflamator sistemic, stimulînd hepatocitele să producă *proteine de fază acută*, cu rol diferit: a) fibrinogenul favorizează agregarea hematiilor și creșterea vitezei lor de sedimentare, indicator clasic al proceselor inflamatorii; b) amiloidul seric A are rolul de regla-

tor prin feedback negativ (imunosupresor) asupra anticorpogenezei; c) proteina C reactivă mărește rezistența la infecții pneumococice, prin legarea de polizaharidele C și formează complexe cu resturile care conțin foforilcholină, care, la rîndul lor, activează complementul, intensifică îndepărtarea țesuturilor lezate prin fagocitoză. Proteina C reactivă are efecte imunostimulatoare și de activare a celulelor NK.

7) IL-1 stimulează producerea de PG și de colagenaze în fibroblaști și în celulele sinoviale și de colagenaze în condrocite și osteoclaste. De asemenea, stimulează producerea de PGE2, fiind răspunzătoare, măcar în parte, de proteoliza, degradarea musculară și cașexia din infecțiile cronice (Oppenheim și colab., 1984).

8) Administrată *in vivo*, IL-1 produce febră, neutrofilie, modificări în concentrația sanguină a mai multor metale (scăderea concentrației Fe necesar pentru creșterea bacteriilor, creșterea concentrației Zn care stimulează migrarea leucocitelor și fagocitoza, ca și producerea de intermediari toxici ai O_2), creșterea concentrației proteinelor de faza acută etc.

În concluzie, IL-1 afectînd un spectru larg de celule din seria leucocitară și extraleucocitară participă direct sau indirect în procese imunitare, inflamatorii, vindecarea unor leziuni etc. Avînd o serie de asemănări cu unii hormoni sau cu mediatori de tipul interferonilor, ar putea juca un rol important și în procesele normale de dezvoltare și/ sau homeostatice. Prezența ei normală și excreția urinară în concentrații mici ar putea fi semnul unui răspuns la un nivel scăzut față de un proces inflamator, dar și al unui rol homeostatic.

Cunoașterea structurii IL-1 a deschis calea unor aplicații terapeutice: medicamentele care stimulează sau mimează efectele ei pot grăbi vindecarea rănilor sau, mai important, antagoniștii ei pot fi utilizați pentru tratarea unor boli inflamatorii (artritele etc.) sau a altor efecte ale IL-1 (cefaleea, durerile corporale, febra etc.), care însoțesc obișnuit infecțiile (Marx, 1985).

Interleukina-2

„Interleukina-2 este șeful de orchestră al imunohormonilor".

D. FRADELIZI

Interleukina-2 (IL-2) a fost descrisă sub mai multe denumiri ca: TCGF („T cell growth factor") de către Morgan și Ruscetti (1975), TAF („Thymocyte activating factor"), TSF („Thymocyte stimulating factor") etc. A fost izolată inițial din culturi de celule T umane stimulate cu PHA, care mimează efectul unui antigen străin. Prezența sa poate fi evidențiată prin capacitatea de a induce proliferarea limfocitelor în culturi (respectiv de a încorpora ^{3}H-timidină).

IL-2 este o glicoproteină (g.m. 15 500 — 17 000 dal), alcătuită din 133 de aminoacizi, a căror secvență este cunoscută și codificată la om de o genă situată pe cromosomul 4. Molecula stabilă chimic și foarte hidrofobă are o anumită rigiditate, conferită de prezența unei legături disulfidice, între Cys 58 și Cys 105, indispensabilă pentru menținerea activității biologice. Componentul glucidic este legat de aminoacidul 3.

Originea celulară a IL-2. Studiile efectuate pe celule T murine au demonstrat că producerea de IL-2 este asigurată în mod obișnuit de celulele T clasice, care stimulează proliferarea și diferențierea celulelor B. Prin contrast, s-a demonstrat că la om produc cantități importante de IL-2 toate subpopulațiile de celule T (helper și citotoxic/ supresor), precum și o subpopulație de limfocite mari granulare (OKT 11^+ și Leu 11^+) (Oppenheim, Ruscetti și Steeg, 1984).

Eliberarea IL-2 din celulele în care a fost produsă implică interacțiunea lectinelor sau a antigenelor cu membranele celulare, prezența produsului genelor Ir (antigenul Ia) și a IL-1. Nu se cunoaște importanța relativă a acestor semnale și nici ordinea în care acționează. În general, IL-2 apare în 4—6 ore de la stimulare, în cantități măsurabile și atinge un nivel maxim după 12—24 de ore.

Receptorul de IL-2. Capacitatea limfocitelor de a răspunde la IL-2 este condiționată de apariția pe suprafața lor a unor situsuri receptoare care au particularități comune cu receptorii de hormoni. Receptorii IL-2 sînt glicoproteine (g.m. ~ 50 000 dal), al căror rol a fost evidențiat de Waldman și Uchiyama (1981): anticorpii monoclonali, care recunosc receptorii IL-2 blochează proliferarea celulelor T activate, prin inhibarea legării IL-2. Efectul proliferant al IL-2 se manifestă la doze foarte mici (100 pg/ml). Interacțiunea receptor—IL-2 este foarte puternică și urmată, după ~ o oră, de endocitarea și transportul ei în celulă, unde este distrusă de enzimele intralimfocitare.

În afară de rolul lor asupra celulelor T, IL-2 ar putea acționa deopotrivă direct pe celulele B, făcîndu-le să prolifereze și chiar să secrete anticorpi. După date recente, receptorii de IL-2 au fost evidențiați pe limfocite B umane și murine activate de diferiți stimuli, pe limfocite B malignizate și pe anumite linii celulare infectate cu virusul Epstein-Barr (Fradelizi, 1985).

Importanța modulării receptorilor IL-2 în reglarea răspunsului imun. Limfocitele în repaus nu posedă receptori IL-2 sau au doar un număr extrem de redus. Intervenția unui semnal activator determină apariția primilor receptori după ~ 6 ore, pentru ca după 48 de ore, ~ 50% din celule să posede receptori. Numărul lor ajunge la ~ 10 000/celulă. În cazul celulelor T umane activate cu PHA, densitatea maximă a receptorilor se observă după 3—7 zile și scade la nivelul de repaus după 10—14 zile, cînd proliferarea celulară încetează chiar în prezența unor concentrații saturante de IL-2. Ca și în cazul celulelor T, limfocitele B activate de un antigen exprimă un receptor de suprafață, care le permite să prolifereze și să se diferențieze în prezența IL-2 (fig. 158).

Mecanismul de acțiune. A fost propus următorul mecanism de acțiune, în care celulele T specific activate de antigen dobîndesc receptorul IL-2, în forma sa activă, și apoi proliferează în prezența IL-2. După legarea antigenului specific, mai multe proteine T3, asociate cu receptorul de antigen, determină disocierea unui fosfolipid membranar — fosfatidil inozitol — la inozitoltrifosfat (ITP) și diacilglicerol (DG). ITP determină mobilizarea Ca^{2+} stocați în celulă, în așa fel încît prin acțiunea asociată

a DG și Ca^{2+} are loc activarea proteinkinazei C. Aceasta activează receptorul de IL-2 prin fosforilare. Procesul este facilitat de prezența unor peptide încă insuficient cunoscute (peptidele X), care ar asigura transducția semnalului chimic de la membrana celulară la nucleu. Final, activitatea unor „pompe" ionice cuplate restabilește reechilibrarea Ca^{2+} de cele două părți ale membranei celulare (fig. 159).

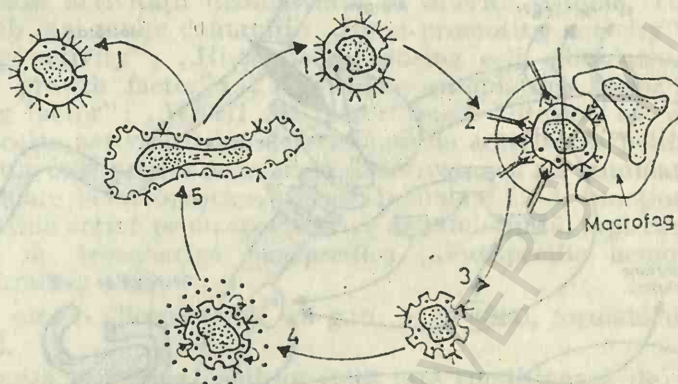


Fig. 158. — Model schematic de proliferare a celulelor T mediată de IL-2 produsă printr-un mecanism autocrin (după Reinherz și colab., 1987): 1 — celulă T ce exprimă un număr mare de receptori de antigen, avînd doar un număr mic de receptori de IL-2 sau chiar nici unul; 2 — activarea indusă de legarea complexului antigen/moleculă CMH sau de anticorpi antireceptor T determină modularea (dispariția) receptorilor T3/Ti, reducerea numărului receptorilor de suprafață pentru antigen și inducția exprimării unui număr mare de receptori de IL-2; 3 și 4 — activarea pe calea receptorilor T3/Ti determină producerea și secreția de IL-2 endogenă și legarea acesteia de receptorii proprii; 5 — cînd numărul situsurilor-receptor ocupate ajunge o densitate critică, încep sinteza de ADN și mitoza. Final, în absența stimulării antigenice adiționale are loc reexprimarea complexului receptor T3/Ti pe suprafața celulelor T.

Activarea receptorului IL-2 permite fixarea IL-2, urmată de sinteza de noi receptori și de declanșarea diviziunii celulare. Celulele suferă o serie de ~10 diviziuni repetate, asociate cu exprimarea receptorilor și legarea acestora de imunohormoni, care întreține proliferarea. Apoi, numărul receptorilor scade progresiv, proliferarea este încetinită și stopată, chiar în prezența IL-2. Reapariția receptorilor și reluarea proliferării celulare sînt condiționate de o reactivare de către antigen. În felul acesta, exprimarea și dispariția receptorilor funcționează ca un mecanism de autoreglare. Acest mecanism face ca *in vivo* (unde există probabil în mod constant concentrații adecvate de IL-2), proliferarea limfocitelor să fie ciclică.

În concluzie, recunoașterea unui antigen străin amorsează producerea unui răspuns imun, a cărui amploare depinde de reglarea fiziologiei receptorilor de IL-2. În ultimă instanță, viteza de diviziune a limfocitelor și amploarea acestui fenomen depind de viteza de apariție a acestor receptori, de numărul lor maxim atins și de ritmul în care dispar (Oppenheim și colab., 1984).

Pe baza cunoștințelor actuale, Fradelizi (1985) propune, prin analogie cu alte sisteme biologice, un model general, parțial speculativ, privind interacțiunile mediate de o adevărată cascadă a interleukinelor (IL-1, IL-2, BCGF, BCDF etc.), care asigură elaborarea răspunsului imun (fig. 159).

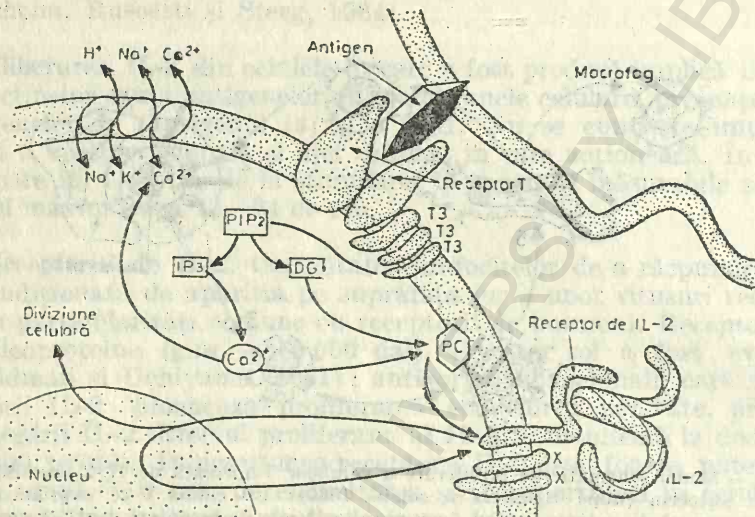


Fig. 159. — Rolul receptorului de IL-2 în evoluția răspunsului imun. După legarea antigenului, mai multe molecule de proteină T3 determină disocierea fosfatidilinozitolului (PIP2) la inozitoltrifosfat (IP3), care determină mobilizarea Ca^{2+} în citoplasmă, și la diacilglicerol (DG; DG și Ca^{2+} activează proteinkinaza (PK), care, la rîndul său, fosforilează RIL-2, stimulînd sinteza de noi molecule de RIL-2 și declanșează diviziunea celulară. Reechilibrarea concentrației de Ca^{2+} de cele două părți ale membranei celulare este asigurată de o „pompă" ionică membranară (după Fradelizi, 1985).

În acest model, stoparea răspunsului imun specific este determinată, în urma eliminării antigenului străin din organism, de dispariția receptorilor de IL-2 de pe suprafața celulelor ce nu mai sînt activate de noi prezentări de antigen și de intervenția celulelor T_S. Efectul imunostimulator al IL-2 este evidențiat și de capacitatea sa de a grăbi răspunsul imun normal. Stimularea cu IL-2 scurtează timpul necesar pentru producerea de anticorpi și/sau de celule T_C, de la 5—7 zile după imunizare, la numai 3 zile. Variațiile în capacitatea de sinteză a IL-2 se traduc în modificări evidente în intensitatea răspunsului imun. Astfel, s-a demonstrat că monocitele indivizilor normali exercită un dublu control asupra producerii de IL-2: a) stimulator prin intermediul IL-1, care determină sinteza de IL-2 de către celulele T_H; b) inhibitor prin formarea de PGE2 care, la rîndul său, determină creșterea numerică a celulelor T_S.

IL-2 are o toxicitate foarte mare, determinînd retenția de lichide, edem pulmonar, dispnee, leziuni hepatorenale etc. Cu toate acestea, IL-2 produsă pe bacterii, prin tehnici de inginerie genetică, este aplicată în prezent experimental, cu toate precauțiile, în tratamentul unor forme

avansate de cancer pulmonar, cutanat sau renal, rezistente la chimio- și radioterapie, cu unele rezultate favorabile (Rosenberg, 1985, 1986). De menționat că IL-2 umană, izolată din organism, este mai puțin toxică decît cea neglicozilată produsă de bacterii.

Interleukina-3

Pe baza activității demonstrate în diferite sisteme, IL-3 a fost descrisă sub mai multe denumiri: „Burst-promoting activity"; „CFUS-stimulating activity"; „Histamine-producing cell stimulating factor"; „Mast-cell growth factor"; „Multicolony-stimulating factor"; „P cell stimulating factor"; „WEHI 3B factor" etc.). Ulterior, s-a demonstrat că toate aceste activități sînt determinate de activitatea polifuncțională a unui factor unic produs de celulele T activate, cu rol stimulator asupra liniilor celulare hematopoetice majore. Denumite IL-3, funcționează ca o hematopoetină activă pe un spectru larg de celule-țintă, fapt care justifică denumirea de *hemopoetină panspecifică* („Panspecific hemopoetin" — PSH) (Schrader, 1986).

IL-3 este o glicoproteină, cu g.m. ~30 kdal, formată din 134 de aminoacizi.

Acțiunea ei asupra celulelor-țintă este condiționată de legarea de un receptor specific, prezent pe suprafața acestora (~1000 receptori/celulă). Legarea determină unele modificări structurale și metabolice intracelulare, puțin cunoscute, care includ creșterea concentrației ATP și o redistribuire a enzimei protein-kinaza între citosol și regiunea membranară.

Sintetizată și eliberată *in vivo* de celulele T activate de antigen, IL-3 are efect local, limitat în vecinătatea celulelor producătoare, adică în situsul în care s-a produs activarea sau în care au migrat celulele activate. Este prezentă în sînge numai după stimuli imunologici puternici (infestări parazitare sau reacții grefă—contragazdă). Rămîne în sînge doar puțin timp (T 1/2 — 40 minute), fiind degradată parțial în rinichi și eliminată în urină. Activitatea stimulatoare a IL-3 se manifestă față de o gamă largă de celule, care includ celulele-stem pluripotente hematopoetice, celulele eritroide, mastocitele, megacariocitele, macrofagele, neutrofilele, eozinofilele etc. Efectele sînt diferite, în funcție de frecvența acestor tipuri de celule în anumite localizări. Astfel, la nivelul mucoasei intestinale stimulează apariția unei mastocitoze locale (Schrader, 1986). În ganglionii limfatici determină creșterea numărului mastocitelor și al celulelor progenitoare, iar în măduvă și splină stimulează producerea de megacariocite, granulocite, neutrofile și eozinofile, metamielocite, macrofage, mastocite etc. Cele mai multe observații arată că nu acționează asupra celulelor T. De asemenea, nu există probe că ar avea un rol în producerea echilibrată (normală) de celule hematopoetice.

Rolul fiziologic al hemopoetinei panspecifice (IL-3) este cel de legătură între sistemul imunitar și sistemul hematopoetic, care furnizează cele mai multe celule auxiliare și accesorii necesare pentru producerea unor reacții de apărare și reparatorii eficiente. Unele date experimentale sugerează posibilitatea utilizării IL-3 sintetice în terapeutică, pentru a

stimula producerea și funcția celulelor de origine hematopoetică, în special după grefele de măduvă.

Interleukina-4

A fost descrisă inițial sub denumirile de *factorul inductor al IgG1* (Bergstedt-Lindquist și colab., 1984) sau de *factorul stimulator nr. 1 al celulelor B* (Noma și colab., 1986) (B cell-stimulating factor no. 1). Denumirea de *interleukină-4* (IL-4) a fost dată de Severinson, Sideras și Bergstedt-Lindquist (1987). Ei consideră IL-4 ca identică sau foarte asemănătoare cu factorul BCDFγ, de diferențiere a celulelor B pentru IgG1 („B cell differentiation factor for IgG1"), descris de Isakson și colab. (1982).

După cum s-a demonstrat, răspunsul imun față de diferite antigene este caracterizat prin apariția anumitor profiluri izotipice. Ele sînt determinate de faptul că sinteza anticorpilor, aparținînd anumitor clase sau subclase, este influențată de mai mulți factori, între care : natura chimică a antigenelor și chiar a determinanților lor de specificitate, calea de administrare, localizarea răspunsului imun, utilizarea adjuvanților etc. (Sideras, 1985).

În anumite sisteme, rolul major în reglarea profilului izotipic revine celulelor T, care mediază acest efect prin intermediul unor factori solubili.

În mod normal, în cazul stimulării cu lipopolizaharide, sinteza de IgM de către celulele B precede secreția de IgG. În general, răspunsul IgG este caracterizat prin formarea a două subclase majore IgG2b și IgG3. Anticorpii de tip IgG1 sînt prezenți doar în cantități mici, în timp ce IgG2a sînt total absenți. Exprimarea atît de diferită a celor patru subclase de IgG nu este corelată cu ordinea regiunii corespunzătoare în genom, care este : 5' → Cγ3 → Cγ1 → Cγ2b → Cγ2a. Sub acțiunea interleukinei-4, răspunsul normal este modificat, în sensul producerii unei cantități mari de IgG1 și al supresiei răspunsului în IgG3 și IgG2b.

Proprietățile fizico-chimice ale IL-4 sînt diferite de principalele interleukine (IL-1, IL-2, IL-3 și IFN). IL-4 are g.m. 20 kdal. Precipită în prezența sulfatului de amoniu saturat (90%). Este sensibilă la degradarea proteolitică. Stabilă la pH 2,0—9,0, este inactivată la pH 10,0. După Sideras (1985), ar fi identică sau foarte asemănătoare factorului BSF-1 („B cell-stimulating factor"), descris de Howard, Paul și colab., 1982.

IL-4 poate fi sintetizată de mai multe linii de celule T, de celulele de limfom, precum și de hibridoame, produse în alte scopuri și menținute în culturi, perioade îndelungate de timp, înainte de a fi utilizate ca sursă pentru factorii stimulatori ai celulelor B (Severinson și colab., 1987).

Activitatea IL-4 este complexă. Pe lîngă funcția de inducere a biosintezei anticorpilor din subclasa IgG1, au fost semnalate următoarele activități :

1) stimularea sintezei ADN în mai multe linii de celule T;

2) capacitatea de a acționa ca factor de creștere pentru mastocite (Rennick, 1986);

3) capacitatea de a se substitui IL-2, prin activarea limfoblaştilor T normali, asociată cu intensificarea sintezei de ADN. Această funcţie s-ar realiza datorită legării IL-4 de receptorul normal de IL-2, la un situs diferit de cel în care se leagă interleukina omologă;

4) deoarece acţionează sinergic în asociere cu PHA, pentru a activa celulele T şi timocitele, ar avea unele proprietăţi similare IL-1.

Spectrul larg de activitate al IL-4 demonstrează că definirea interleukinelor, în general, pe baza funcţiei lor este foarte incertă, în comparaţie cu cea realizată pe baza structurii şi proprietăţilor fizico-chimice.

În prezent, nu se ştie dacă celulele B poartă receptori specifici pentru IL-4 şi nici dacă acestea au un rol fiziologic în comutarea fiziologică a izotipului de IgG şi/sau în sinteza de ADN.

Interleukina-5

A fost descrisă iniţial sub denumirea de *factorul înlocuitor al celulelor T* („T-cell replacing factor") (Takatsu şi colab., 1980; 1985). Denumirea de *interleukină-5* (IL-5) a fost propusă de Kinashi, Azuma şi colab. (1986), pentru a desemna un factor solubil produs de mai multe linii de celule T umane şi murine, încă incomplet caracterizat chimic. După Kinashi şi colab. (1986), precum şi după Azuma şi colab. (1986), IL-5 ar fi identică cu *factorul II de creştere a celulelor B* („B-cell growth factor II").

IL-5 înlocuieşte funcţia celulelor T_H, favorizînd sinteza de IgM şi ulterior de IgG, de către mai multe tipuri de celule B. Pe lîngă funcţia de stimulare a anticorpogenezei, IL-5 acţionează şi ca factor de diferenţiere a eozinofilelor. De aici şi denumirea de „Eosinophil differentiation factor" sub care a fost descris de Sanderson şi colab. (1986).

Interleukina-6

Cel mai puţin studiată, interleukina-6 a fost descrisă sub trei denumiri, care ilustrează proprietăţile ei şi anume *factorul 2 stimulator al celulelor B* (BSF-2, „B cell stimulatory factor 2"), *interferon*-β2 şi *factorul stimulator al hepatocitelor* („Hepatocyte-stimulating factor").

Factorul necrozant al tumorilor („Tumour necrosis factor", TNFα sau „cachectin"), produs de macrofage, este o proteină formată din 157 de aminoacizi, a căror secvenţă a fost determinată. Denumirea reflectă proprietatea care a permis identificarea lui.

Cercetările ulterioare au demonstrat că, în realitate, are o acţiune mult mai complexă datorită căreia participă la elaborarea răspunsului faţă de infecţii şi alte agresiuni ale organismului (Old, 1988). Cele mai importante sînt următoarele:

1) acţionează direct asupra granulocitelor, mărind capacitatea lor de adeziune pe suprafaţa peretelui vascular şi migrarea în ţesutul lezat;

2) împreună cu IL-1, măreşte adezivitatea celulelor endoteliale, facilitînd marginaţia şi adeziunea granulocitelor;

3) stimulează capacitatea granulocitelor de a produce metaboliţi toxici ai oxigenului, care omoară bacteriile invadatoare;

4) împreună cu IL-1, participă la activarea celulelor T, care, la rîndul lor, produc factori stimulatori ai coloniilor, interferon γ etc.;

5) în asociere cu IL-1, reglează producerea anticorpilor de către limfocitele B și acționează asupra mai multor tipuri de celule pentru a secreta factori stimulatori ai coloniilor;

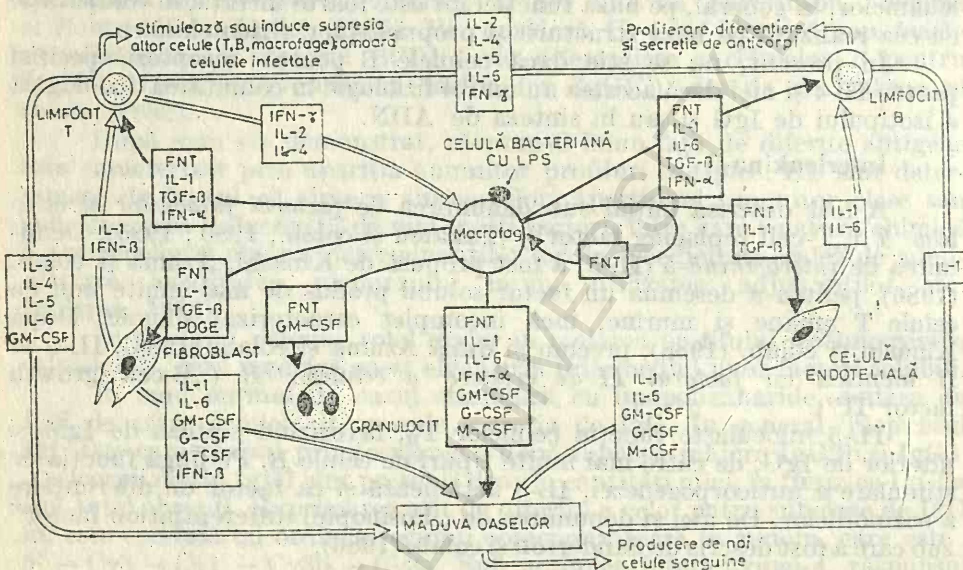


Fig. 160. — Factorul necrozant al tumorilor (FNT) secretat de macrofagele stimulate de lipopolizaharidele bacteriene împreună cu IL-1 și alți factori produși de macrofag influențează limfocitele T și B, celulele endoteliale, fibroblaștii și granulocitele, precum și precursorii celulelor sanguine din măduvă. Ele își îndeplinesc rolul în apărarea față de infecții, limitarea și repararea leziunilor fie direct, fie prin sinteza și eliberarea unor mediatori ca IL, IFN-α și IFN-β, factori de creștere (GF), factori stimulatori de creștere (CSF). G — granulocit; M — monocit — macrofag (modificat după Odd, 1988).

6) împreună cu IL-1, acționează direct asupra centrilor nervoși din creier pentru a determina apariția febrei;

7) mărește eliberarea proteinelor de fază acută („Acute-phase proteins") sintetizate în ficat, care au un rol esențial în creșterea eficienței reacțiilor inflamatorii. Activitatea acestora pare să fie reglată de IL-6, sintetizată de mai multe tipuri de celule stimulate de TFN, de IL-1 sau de interferoni (fig. 160).

Limfotoxinele („Tumour necrosis factor-β") sînt substanțe structural și funcțional înrudite cu TNF. Pe aceste criterii, fac parte din aceeași familie cu acesta, deși sînt produse de limfocitele T activate. Limfotoxinele au capacitatea de a omorî unele tipuri de celule-țintă *in vitro*, printr-o acțiune asemănătoare celei a limfocitelor citolitice sensibilizate. După Kehrl (1987), care a demonstrat capacitatea lor de a stimula proliferarea

celulelor B *in vitro*, funcţia lor majoră ar fi de amplificare a răspunsului umoral în organism.

Factorii activi pe celulele B

Trecerea de la stadiul de limfocit B în repaus la cel de plasmocit producător de Ig implică trei etape succesive: 1) activarea celulelor B consecutivă contactului cu antigenul specific; 2) proliferarea celulelor activate şi 3) diferenţierea la plasmocite.

Factorul de proliferare a limfocitelor—BCGF („*B* cell *g*rowth *f*actor") sau, după o denumire propusă recent, factorul stimulator al celulelor B (BSF-1 („B cell stimulatory factor"; Paul, 1984, 1985), este produs de celulele T_{H} în prezenţa macrofagelor.

Identificat de Howard (1982), a fost purificat de Maizel (1985) din culturi de limfocite umane stimulate cu PHA. Este foarte înrudit structural cu IL-2. Inactiv pe celulele B în repaus, induce sinteza de receptori membranari specifici pe suprafaţa celulelor B activate specific de antigene. Acţionează sinergic cu IL-1, determinînd proliferarea celulelor B.

Factorul de diferenţiere a celulelor B — BCDF, denumit mai recent TCF („T cell replacing factor"), acţionează după BCGF, inducînd diferenţierea celulelor B proliferate la plasmocite.

Recent, Friedman şi colab. (1984) au identificat un alt factor, IBF („Inducing B factor"), care permite celulelor B să-şi orienteze opţiunea pentru o anumită clasă de Ig care va fi sintetizată.

La şoarece au fost identificaţi patru tipuri de factori fiecare avînd mai multe denumiri, în funcţie de condiţiile de izolare, respectiv de activitatea biologică evidenţiată în supernatantul culturii de limfocite:

1) BSFp-1, care determină proliferarea celulelor B în prealabil activate;

2) BCDF sau TRF, care determină maturarea finală a celulelor B la plasmocite;

3) BCGF-2, care stimulează atît proliferarea, cît şi diferenţierea celulelor B activate;

4) BCAF, care stimulează proliferarea celulelor B neactivate (Leclerc şi These, 1984).

Probabil că unii din aceşti factori sînt identici. Ei acţionează asupra celulelor B într-un mod asemănător celui descris în cazul acţiunii IL-2 asupra celulelor T, respectiv prin apariţia pe suprafaţa celulelor B activate a unui receptor pentru factorii care induc proliferarea şi diferenţierea (Fradelizi, 1985).

După Dinarello şi Mier (1987), legarea celulelor B virgine sau de memorie în repaus de antigen le converteşte la stadiul de celule B mari proliferante a căror evoluţie este condiţionată de intervenţia factorilor de creştere sau stimulatori B: factorul stimulator 1 identic cu IL-4 căruia la om i se adaugă un al doilea factor de creştere B neînrudit (Sharma şi colab., 1987). După ce proliferarea a fost iniţiată intervine

factorul de diferenţiere B (factorul stimulator-2) identic cu IFN-β_2 şi cu factorul stimulator al hepatocitului (van Damme şi colab., 1987), care dirijează evoluţia celulei B la plasmocit. IL-1, care are rol în activarea celulelor B stimulează sinteza acestui factor.

Limfokinele care participă în diferite stadii de maturare a celulelor B au de asemenea rol în determinarea izotipului de Ig sintetizat. IL-1, IL-2, IFN-β şi IFN-α, în general, măresc acţiunea limfokinelor care stimulează celulele B (Nakagawa şi colab., 1986).

Interferonii

Interferonii formează o clasă de substanţe inductibile, de natură glicoproteică, cu activitate biologică pleiotropă, produse de unele celule eucariote ca răspuns la un număr mare de stimuli. Substanţe cunoscute iniţial ca avînd un efect limitat, tipic antiviral, exercitat prin intermediul metabolismului celular, interferonii au o activitate complexă, antiproliferativă celulară, antitumorală şi imunomodulatoare.

Clasificare şi nomenclatură. Primele date care au demonstrat heterogenitatea interferonilor (IFN) au fost bazate pe stabilitatea (IFN tip I) sau labilitatea (IFN tip II) la pH 2,0 (Salvin şi colab., 1975). Descrierea a trei categorii antigenice a dus la caracterizarea IFN leucocitar, fibroblastic şi imunitar (limfocitar), numiţi în prezent α, β şi γ, cu proprietăţi fizicochimice şi biologice diferite.

Clasificarea IFN întîmpină unele dificultăţi datorită observaţiei că un anumit tip de celulă poate produce mai multe tipuri de IFN (Hiscott şi colab., 1984) şi că, spre exemplu, IFN α uman există sub forma a cel puţin 12 subtipuri diferite, fiecare codificat de o anumită genă. Abrevierea internaţională recomandată pentru substanţele din categoria interferonilor este IFN, precedată de un acronim pentru specia animală de care a fost produs (Hu — uman; Mu — murin; Bov — bovin etc.).

Caracteristicile moleculare ale IFN

Studiul interferonilor este mult îngreuiat de dificultăţile de izolare şi purificare, deoarece au o serie de proprietăţi fizicochimice comune cu impurităţile din preparat şi sînt produşi *in vivo* în cantităţi foarte mici: cele mai bune celule producătoare sintetizează 10^5 unităţi per 10^7 celule.

IFN α sînt produşii unei familii multigenice, avînd între ele o omologie de ~80%. Cînd leucocitele sau celulele limfoblastoide sînt induse să sintetizeze IFN α o parte din aceste gene sînt derepresate, determinînd formarea unui amestec de diferite tipuri de IFN α.

Natura IFN α diferă şi în funcţie de stadiul de diferenţiere a leucocitelor producătoare. Heterogenitatea IFN depinde de succesiunea diferită a aminoacizilor şi/sau de modul de glicozilare. Zoon şi Wetzel (1984) au determinat structura predictibilă a IFN (fig. 161), care, pe baza analizei structurale şi a unor experienţe funcţionale, sugerează o corelaţie clară între IFN α şi β, în timp ce IFN γ este, în cel mai bun caz, foarte îndepărtat corelat cu aceştia.

IFN β, produs de fibroblaşti, este codificat de o singură genă la oni şi de două gene la bovine. Genele pentru IFN α şi β sînt localizate pe acelaşi cromosom şi, deşi au numai o omologie de 30%, par să fie derivate dintr-un ancestor comun. IFN β are g.m. ~20 000 dal şi un conţinut mare de glucide. La şoarece, genele α şi β sînt exprimate simultan cu producerea de IFN α/β (Kirchner, 1986).

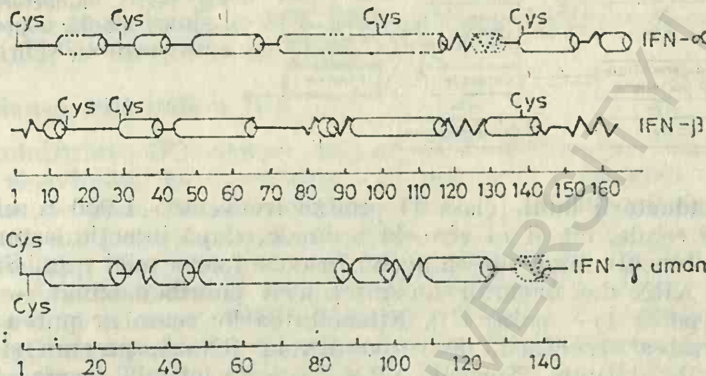


Fig. 161. — Structura secundară probabilă a interferonilor umani IFN-α (A), IFN-β (B) şi IFN-γ (C) obţinută prin aplicarea algoritmului lui Garnier secvenţelor aminoacizilor deduse din clonarea ADNc. Sînt prezentate numai structurile de α-helix (cilindri) şi catenele extinse (β-structuri, în zigzag) a căror localizare poate fi prevăzută cu mai multă acurateţe (după Zoon şi Wetzel, 1984).

IFN γ imunitar este prin definiţie o limfokină imunoreglatoare. Genele pentru IFN γ au doar o foarte mică omologie cu genele α şi β. IFN γ are g.m. 17 500–23 500 şi un mare conţinut în glucide; IFN cu g.m. mai mari sînt probabil oligomeri.

Producerea de IFN γ este o funcţie specializată a celulelor T activate de antigene sau de mitogeni şi a celulelor LGL („Large granular lymphocytes"), cunoscute funcţional sub denumirea de celule NK, a căror poziţie în sistemul celulelor hematopoetice este neclară. Raportat la numărul moleculelor necesare pentru a determina un efect biologic, IFN γ este una dintre proteinele cele mai active (Djeu, 1982).

Inductorii sintezei de IFN

Majoritatea autorilor consideră că IFN nu sînt produşi spontan, unele celule avînd însă posibilitatea de a răspunde la un număr de stimuli inductori *in vivo* şi *in vitro*. Sinteza începe după cîteva ore de la inducţie, pe polisomii legaţi de membrane, durează o perioadă scurtă de timp şi este urmată de o perioadă refractară, în care celulele sînt incapabile să mai producă IFN (Cantell, 1978). Electroforeza bidimensională a evidenţiat sinteza *de novo* asociată a încă 23 de proteine, a căror semnificaţie nu este cunoscută. Inducţia este un proces foarte bine reglat şi apare după o expunere scurtă la acţiunea inductorului. Răspunsul poate fi

intensificat prin tratarea prealabilă a celulelor cu IFN („Priming")

Au fost descrise două tipuri de inductori (Ho și Armstrong, 1975) (fig. 162):

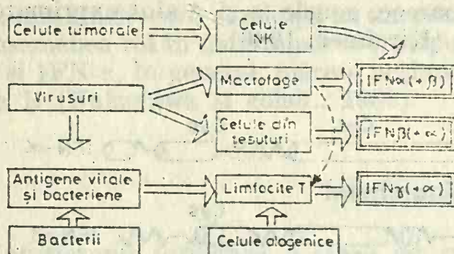


Fig. 162. — Inductorii și celulele implicate în producerea interferonilor *in vivo*.

1) **Inductorii buni** (clasa I) produc frecvent > 1 000 u/ml, atît în culturi de celule, cît și *in vivo*, la animale, după injecție sistemică (i.v. sau i. peritoneal). Sînt adesea activi în doze foarte mici (μg). Sînt reprezentați de ARN d.c. naturali sau sintetici ca poliriboinozinat — poliribocitidilat [poli(r I) — poli(r C)]. Eficacitatea lor mare ar putea fi legată de stabilitatea structurii, de rezistența la RNază, precum și de g.m. (> $1,5 \times 10^5$ dal) etc. Normal, ARN d.c. este întîlnit, *in vivo*, în cursul replicării virusurilor cu genom ARNm (forma intermediară, replicativă), ca și în replicarea ADN viral asociată cu transcrierea simetrică la ARN.

2) **Inductorii slabi** (clasa II) produc < 1 000 u/ml și sînt activi numai după injectarea sistemică la șoarece a unei doze mari (mg) (sînt ineficienți în culturi de celule). Sînt reprezentați de un grup heterogen din punct de vedere biochimic, și includ de la microorganisme intracelulare (*Rickettsia*, *Bordetella*, *Brucella*, *Listeria*, *Salmonella*, *Francisella*, *Toxoplasma* etc.) la produși bacterieni (endotoxine, lipopolizaharide), manani fungici, polimeri (acid poliacrilic, polivinil sulfat etc.) și chiar la substanțe cu g.m. mică (kanamicină, cicloheximidă etc.). În opoziție cu alți autori, Bocci (1981, 1985) consideră că IFN pot fi produși, în mod normal, de inductori naturali, datorită faptului că mucoasele oferă o suprafață imensă de contact prin care pot pătrunde diferite virusuri, toxine, substanțe chimice alergene, lectine vegetale, medicamente, proteine heterologe etc. Acestea sînt infiltrate cu celule limfocitare și macrofage, excelente producătoare de IFN.

Sinteza fiziologică este importantă, datorită prezenței ei la situsuri strategice, esențiale pentru sistemele de apărare a gazdei. Frecvența mărită a bolilor imune și a tumorilor la bătrîni ar fi corelată cu scăderea producerii fiziologice de IFN.

Controlul genetic al producerii IFN a fost demonstrat înainte de identificarea, izolarea și clonarea genelor pentru IFN, prin evidențierea existenței unor linii genetice înalt producătoare sau slab producătoare. Zawatzky și colab. (1982) au arătat că locusurile genetice care controlează producerea masivă de IFN, după infectarea cu Herpes virus, sînt diferite de cele care reglează producerea după infecția cu virusul Newcastle.

Spectrul de activitate. Fiecare tip de IFN este caracterizat printr-un spectru propriu de gazde, cu tendința de a avea activitatea cea mai mare asupra celulelor speciei din care provine. IFN α uman este activ pe celule de om, maimuță, bovine, feline și porcine, în timp ce IFN β uman este activ numai pe celule umane. IFN provenit de la bovine și șobolan este activ la om. Spectrul de specii este dat probabil de natura receptorilor celulari și de o secvență (probabil componentă glucidică) a IFN, care este capabilă să recunoască receptorii specifici. Acțiunea este foarte puternică, 1—10 molecule de IFN fiind suficiente pentru a proteja nespecific o celulă, de inocularea de probă cu un virus.

Acțiunea antivirală a IFN

Administrarea IFN este asociată cu o serie de fenomene care reflectă, evident, activitatea lor antivirală: 1) reducerea numărului unităților formatoare de plaje de liză celulară (PFU — „plaque forming units") *in vitro*; 2) diminuarea sintezei de ARN viral; 3) atenuarea sau suprimarea efectelor citopatogene etc.; 4) administrarea de ser anti-IFN diminuă rezistența șoarecelui față de infecțiile virale, pe care le agravează în mod evident (Gresser, 1976). Zawatzky (1981) a evidențiat existența unei corelații riguroase între dinamica formării IFN și rezistența la infecția cu Herpes virus. Titrul local maxim de IFN este produs după 2—4 ore de la infecție, în timp ce primul ciclu de replicare virală necesită 8 ore (fig. 163).

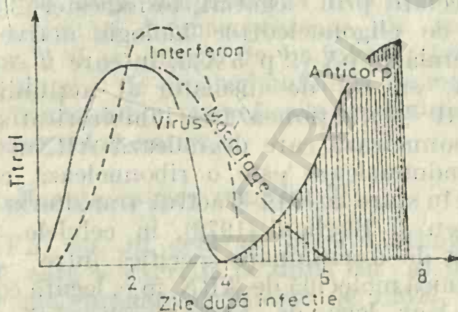


Fig. 163. — Dinamica apariției interferonilor, a macrofagelor activate și a anticorpilor în cursul unei infecții virale. Concentrația virusului scade pe măsură ce se produc cantități crescute de interferon.

IFN influențează numai anumite etape de existență intracelulară a virusurilor (decapsidarea, replicarea sau transcrierea genomului, traducerea la proteine sau unele etape preliminare ale asamblării), în funcție de natura acestora. Nu pot acționa asupra adsorbției sau viropexiei. În cazul virusului stomatitei veziculare, spre exemplu, producerea de virioni este diminuată la 30—100% prin încorporarea redusă a proteinelor de membrană (M) și a glicoproteinelor (G). Efectul protector este maxim asupra celulelor adiacente și slab față de cele îndepărtate. Starea antivirală indusă poate fi transmisă altor celule printr-un mecanism necunoscut, independent de IFN.

Interferonii produc unele efecte secundare, care mimează simptomele infecției gripale sau ale unor infecții sistemice acute (frison, stare generală

proastă, apatie, efecte psihoneurologice (ca depresiune psihică, modificări electroencefalografice etc.) sau, uneori, similare bolilor autoimune. După Scott (1981), simptomele gripei sînt în parte determinate de IFN și nu de virusul infectant. Unii cercetători contestă rolul antiviral al IFN, pe baza existenței unor infecții virale generalizate coexistente cu un titru ridicat de IFN. Explicația rezidă în faptul că în cazul unei răspîndiri a virusului în organism producerea de IFN are o influență slabă asupra evoluției infecției.

Modificări biochimice implicate în activitatea antivirală. Datorită dificultăților obiective de studiu, bazele moleculare ale activității IFN au fost stabilite mai ales prin cercetări *in vitro*. După cum s-a demonstrat, IFN se leagă inițial de un lipopolizaharid de pe membranele celulare, după care interacționează cu receptorii specifici, cu mare afinitate de legare, codificați la om de o genă localizată pe cromosomul 21 (Ravel Bash și Nuddle, 1973).

Rolul 2-5-A-sintetazei și al sistemului 2-5-A. Roberts și colab. (1976) au arătat că în extractele de celule L de șoarece, tratate cu IFN, incubate cu ARN d.c. și ATP, are loc sinteza unui inhibitor al sintezei proteinelor cu g.m. mică și termostabil (100°C), a cărui formare este dependentă de ARN d.c. și ATP. Ulterior s-a demonstrat că toți IFN induc sinteza enzimei *oligonucleotid polimeraza* sau *2-5-A-sintetaza*, activă numai în prezența ARN d.c. și a ATP. Ea formează de la ATP scurte catene de adenozină (adenină + riboză), legate prin punți 2'-5'-fosfodiester (Kerr și Brown, 1978), un tip de legături absolut unic, pentru că toate polinucleotidele naturale sînt conectate prin legături fosfodiester 3'-5'. Se produce astfel o clasă nouă de oligonucleotide biologic active (2'-5' oligoadenilat), cu formula generală pppA (2'p 5'A)n, în care $n = 1-10$, notată cu acronimul de 2-5-A, cu rol de mediator al acțiunii IFN.
În cantități foarte mici (10^{-9}M), acționează ca inhibitori ai sintezei proteinelor, activînd o endoribonuclează care degradează ARNm și blochează sinteza proteinelor. Endonucleaza este o ribonuclează cu g.m. ~180 000 dal, prezentă normal în stare latentă și activă tranzitoriu numai în prezența 2-5-A. După Nilsen și Baglioni (1979). în celulele tratate cu IFN ar exista un mecanism de discriminare specifică între ARNm viral și celular reprezentat de o mică moleculă de ARN m.c. legată covalent de ARN d.c. 2-5-A-sintetaza s-ar lega de forma replicativă virală, ar fi activată și ar sintetiza 2-5-A. Endoribonucleaza, prezentă în vecinătate, s-ar asocia acestui complex, ar fi, la rîndul său, activată de 2-5-A și ar degrada catenele nascînde de ARNm viral. În celulele infectate cu virusuri, efectul este foarte puternic, deoarece ele nu pot supraviețui scăderii totale a sintezei proteice produse de virus și de 2-5-A. Celulele infectate mor și propagarea virusului este stopată înainte de a se extinde la celulele neinfectate.

Rolul proteinkinazei. IFN induc și sinteza unei proteinkinaze. Aceasta fosforilează factorul de creștere („Elongation factor") *eiF 2*, cu rol critic în traducerea informației genetice, și determină stoparea sintezei proteinelor. Prezența 2-5-A-sintetazei și a activității proteinkinazei reprezintă markeri biochimici ai existenței IFN în celule. Rolul lor este demonstrat

şi de faptul că cinetica efectului antiviral urmează riguros pe cea a inducţiei acestor enzime. Esenţiale în unele sisteme celulare, aceste enzime pot deveni accesorii în altele.

Rolul fosfodiesterazei. IFN induc sinteza unei fosfodiesteraze, care clivează secvenţa terminală 3' CCA a ARNt şi împiedică legarea aminoacizilor. După Zilberstein şi colab. (1976), inhibarea dependentă de ARNt ar fi o proprietate specifică pentru ARNt Leu şi ar inhiba creşterea catenei proteice.

Alte activităţi ale IFN implicate în rezistenţă şi imunitate.

Influenţele asupra activităţii macrofagelor sînt multiple şi implică:

a) creşterea numerică a macrofagelor şi a particulelor ingerate;

b) intensificarea imunofagocitozei, prin exprimarea crescută a receptorilor Fc pentru Ig;

c) activarea metabolismului şi producerea unor cantităţi importante de intermediari ai O_2, cu creşterea efectelor microbicide şi tumoricide;

d) stimularea producerii de enzime lizosomale şi creşterea capacităţii de a distruge sau detoxifica agenţi şi respectiv substanţe nedorite;

e) intensificarea activităţii tumoricide, prin stimularea factorului MAF („Macrophage activating factor");

f) iniţierea răspunsului specific prin creşterea frecvenţei moleculelor (CMH) clasa II pe macrofag şi pe celulele „accesorii", în general;

g) pe lîngă amplificarea funcţiilor imunostimulatoare, IFN scad unele activităţi imunosupresoare ale macrofagelor asupra proliferării celulelor T şi producerii de limfokine. Acest rol s-ar exercita prin diminuarea sintezei de prostaglandine şi de metaboliţi ai O_2. Datorită acestor funcţii, în ansamblu, macrofagele pretratate cu IFN γ au funcţii cu mult superioare celor normale.

Influenţa asupra celulelor T

IFN au, în general, un rol stimulator asupra răspunsului celulelor T, care se exercită pe două căi: a) prin exprimarea crescută a moleculelor membranare codificate de CMH, cu rol crucial în interacţiunile celulelor imunocompetente; b) direct, prin stimularea apariţiei receptorilor de IL-2 în număr mare pe celulele T. Fenomenul determină o mai mare expansiune a celulelor T_H şi T_C, a căror proliferare depinde de acţiunea IL-2.

IFN stimulează citotoxicitatea celulară dependentă de anticorpi, respectiv liza celulelor-ţintă, determinată de celulele T şi de macrofagele activate, prin exprimarea crescută pe suprafaţa lor a receptorilor FcIg. În funcţie de doză, de momentul administrării şi/sau de structura genetică a organismului, IFN pot mări sau supresa răspunsul imun. Astfel, administrat înainte de sensibilizarea cu un antigen, IFN reduce semnificativ răspunsul de tip hipersensibilitate întîrziată, în timp ce după sensibilizarea la antigene, îl intensifică masiv, după infecţia declanşatoare. În funcţie de doză, IFN cresc sau scad producerea de limfokine de către celulele T,

stimulate de lectine. Aceste rezultate, aparent contradictorii, sînt probabil rezultatul acțiunii IFN pe subpopulații diferite de celule T sau pe celule aflate în diferite stadii de activare.

Acțiunea asupra celulelor NK. IFN amplifică efectele celulelor NK prin intervenția unor mecanisme potențial asociabile ca: 1) inducerea unor structuri pe suprafața lor, cu rol în recunoaștere; 2) activarea celulelor inactive la stadiul citolitic; 3) creșterea vitezei litice a celulelor NK active: 4) scurtarea timpului de reciclare a celulelor NK între celule-țintă.

Celulele LGL („Large granular lymphocytes"), cu activitate NK, sînt bune producătoare de IFN γ și α, cînd sînt expuse la acțiunea virusurilor, mitogenilor, celulelor tumorale etc. Probabil că în cursul activării lor, celulele NK Lyt-5' răspund la stimulul antigenic prin producere de INF, care apoi activează celulele precursor NK Lyt-5^- să evolueze spre stadiul de celule efectoare NK Lyt-5^+. Unele observații contradictorii, aparent paradoxale, ca, de exemplu, scăderea sensibilității celulelor-țintă față de liza NK sau unele efecte supresoare asupra celulelor T, nu fac decît să demonstreze complexitatea interacțiunilor celulare în prezența IFN. Interferonii au rol în diferențierea sistemului leucocitar, în general, iar IFN γ ar influența maturarea limfocitelor B în repaus la plasmocite (Sidman și colab., 1984).

Acțiunea antitumorală a IFN. IFN inhibă creșterea tumorilor induse de virusuri sau de agenți chimici la șoarece. Mecanismul este necunoscut, putînd fi atribuit efectelor antiproliferative celulare în general. Brouty-Boye (1980) și Hicks (1981) au descris reversia fenotipului malign la normal, în cazul celulelor transformate, cultivate timp îndelungat *in vitro*, în medii cu IFN. Fenomenul pare să fie datorit capacității IFN de a inhiba exprimarea genelor *onc* și odată cu aceasta reversia fenotipului malign.

Deși nu sînt produși de glande sau de celule specializate și apar rar în ser, prin varietatea efectelor lor, prin activitatea puternică reflectată prin numărul mic de molecule suficiente pentru protecția unei celule și prin transmiterea de mesaje specifice intercelulare către celulele-țintă, purtătoare de receptori specifici, IFN pot fi considerați ca adevărați imunohormoni cu rol esențial în reacțiile de apărare a organismului. Faptul că IFN pot fi induși nu numai de stimulatori imunologici, ci și de mitogeni arată că ar putea avea rol și în apărarea nespecifică.

Studiul limfokinelor, în general, sugerează existența unui circuit IL-1 → IL-2 → IFN → IL-1, care acționează ca o buclă de feedback pozitiv. Dependența de stimuli exteriori a acestui circuit de interacțiune dintre citokine și celule împiedică apariția unor reacții inflamatorii excesive. Prin acțiunea lor asupra a numeroase celule imunitare și prin influența asupra producerii altor limfokine, IFN se comportă ca imunoactivatori și imunoregulatori cu caracter general. Este probabil că și alte celule, diferite de cele identificate, ar putea fi producătoare de IFN, încît organismul ar dispune de o rețea largă de mecanisme de apărare, care nu include numai celulele implicate ± direct în imunitate, ci și alte celule.

Biosinteza anticorpilor

„În prezent, sistemul imunitar este bine cunoscut la nivel celular, biochimic și genetic, iar înțelegerea modului de formare a anticorpilor este unul dintre numeroasele mistere rezolvate ale imunologiei".

G. L. Ada, Sir G. Nossal

Mecanismele moleculare ale anticorpogenezei au preocupat un număr mare de cercetători, fapt reflectat de diferitele ipoteze și teorii formulate de-a lungul anilor :

Ipoteze bazate pe participarea antigenului:

a) Buchner (1893): antitoxinele se formează direct din toxine, prin anumite transformări simple; b) Hertzfeld și Klinger (1918): anticorpii ar fi produși rezultați din clivarea specifică a antigenelor în organism; c) Ramon, Locke, Main, Hirsch (1926—1930): anticorpii ar fi proteine speciale, prezente normal în organism.

Teorii instructive:

1) Teorii bazate pe modelul matriței directe: a) Bail (1909); b) Thiel și Embleton (1914): anticorpii ar deriva din sistemul complement, sub influența unor modificări induse de antigen; c) Ostromuislensky (1915); d) Haurowitz și Breinl (1915); e) Topley, Mudd și Alexander (1930—1932); f) Pauling (1940); g) Karush (1958).

2) Teorii bazate pe modelul matriței indirecte: a) teoria adaptării enzimatice (Burnet, 1941); b) teoria matriței indirecte (Burnet și Fenner, 1945); c) teoria imunocatalizei (Sevag, 1951); d) teoria antigenului ca matriță inductoare (Schweet și Owen, 1957).

Teorii selective:

a) teoria mecanicii cuantice (Jordan, 1940)); b) teoria selecției naturale (Jerne, 1955); c) teoria selecției clonale (Burnet, 1957); d) teoria geneticii moleculare (Szilard, 1960).

Teoriile instructive diferă între ele prin unele detalii, dar au în comun ideea de bază că în celulele producătoare de globuline normale ar exista o moleculă specială cu rol de „model", care ar funcționa ca un adevărat „tipar" sau „matriță" pentru sinteza moleculelor de globuline. În urma pătrunderii unui antigen în aceste celule, configurația „tiparului" molecular de sinteză globulinică s-ar modifica, datorită grupărilor determinante de specificitate (epitopilor) ale antigenului.

În acord cu ipoteza cea mai cunoscută, a „matriței" directe (Pauling, 1940; Haurowitz, 1952), structura primară a tuturor anticorpilor ar fi identică, pentru că secvența aminoacizilor ar fi aceeași ca și în globulinele normale. Deosebirea esențială între anticorpii cu specificități diferite rezidă numai în conformația tridimensională a moleculei lor, rezultînd din aranjarea spațială diferită a unor lanțuri polipeptidice chimic identice. Antigenul ar determina natura specifică a anticorpului în curs de formare,

combinîndu-se cu lanțurile de globuline nou sintetizate, înainte ca acestea să se dispună în configurația spațială caracteristică. Interacțiunea dintre antigen și acest lanț ar determina aranjarea unei părți a moleculei de anticorp în jurul determinantului antigenic, în așa fel încît acea parte a moleculei de anticorp să devină complementară față de porțiunea din antigen după care s-a pliat. Prin urmare, specificitatea anticorpilor ar fi conferită nu în momentul sintezei lanțului lor polipeptidic, adică la secvențializarea (diataxia) aminoacizilor, ci într-un stadiu ulterior, atunci cînd are loc plierea acestui lanț, pentru a lua o anumită configurație spațială.

Pentru a evita unele din neajunsurile teoriei „matriței directe", Burnet și Fenner (1949) au elaborat „teoria matriței indirecte". După această concepție, antigenul ar acționa indirect, prin intermediul unor alterări a enzimelor intracelulare ce participă la sinteza lor. Ele ar fi determinate de pătrunderea antigenelor în nucleu, unde ar forma o „genocopie" a determinantului antigenic. În felul acesta, celulele producătoare de anticorpi ar putea rămîne active toată viața, ca depozitare ale funcției de „memorie imunologică".

Critica teoriilor instructive. Teoriile instructive nu explică o serie de fenomene demonstrate experimental, ca, de exemplu :

1) prezența antigenelor marcate radioactiv în macrofage (Ada și Nossal, 1962) ;

2) creșterea exponențială a producerii anticorpilor în primele stadii ale răspunsului imun ;

3) existența regiunilor variabile și hipervariabile în structura catenelor L și H ;

4) capacitatea organismului de a deosebi substanțele self de non self ;

5) dacă antigenul este necesar ca matriță pentru fiecare moleculă de anticorp, este inexplicabil mecanismul prin care numărul anticorpilor devine într-un timp scurt, enorm, în raport cu cel al moleculelor de antigen ;

6) nu explică memoria imunologică și răspunsul secundar, mai intens decît cel primar ;

7) nu explică afinitatea mărită a anticorpilor, pe măsură ce se desfășoară răspunsul imun ;

8) nu explică fenomenul de toleranță imunologică.

Paralel cu aceste critici, un rol esențial spre dezvoltarea unor teorii selective l-au avut o serie de descoperiri importante și formularea unor concepte noi, între care cele mai importante sînt următoarele :

1) anticorpii sînt imunoglobuline naturale cu un foarte mare grad de diversitate biochimică ;

2) celulele producătoare (limfocitele B) sînt capabile de proliferare și diferențiere ;

3) formarea anticorpilor este o formă de proces biologic adaptativ ;

4) memoria imunologică are o bază celulară. Ea este universală (respectiv se manifestă atît față de substanțele self, cît și față de nonself) și este atît pozitivă (anamnestică), cît și negativă (toleranță imunologică);

5) specificitatea anticorpilor nu este absolută, ci este bazată pe combinări de anticorpi cu un spectru larg de aviditate (Talmage, 1985).

Teoriile selective. Prima teorie selectivă a fost formulată de Ehrlich (1900), sub denumirea de teoria catenelor laterale („Side-chain theory"), după care anticorpii erau considerați ca fiind constituenți naturali ai suprafeței leucocitelor, sub forma unor catene laterale (fig. 164), care au, *ab initio*, o configurație structurală ce determină specificitatea față de un anumit antigen. Rolul acestuia ar fi limitat în a recunoaște și selecționa din multitudinea de "catene laterale" existente în organism pe cele de

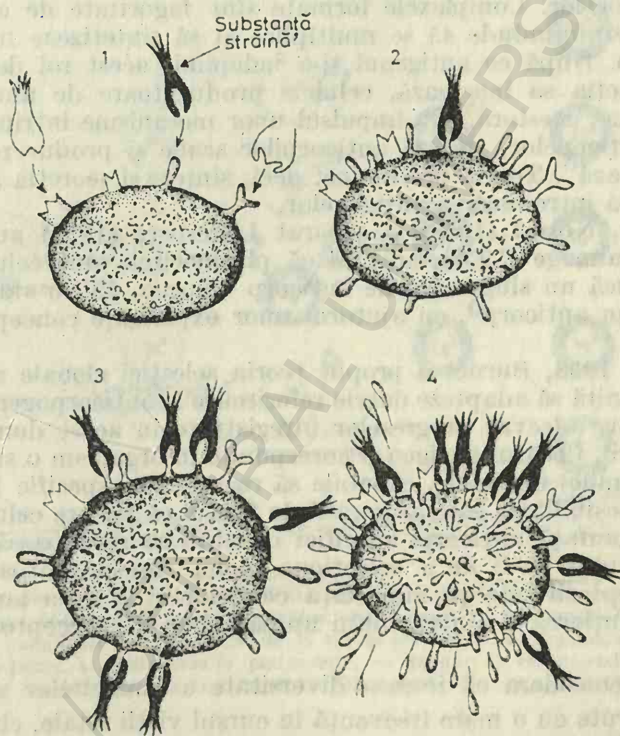


Fig. 164. — Reprezentarea schematică a teoriei catenelor laterale, ilustrînd modul în care o substanță străină se leagă de un receptor celular (1, 2) și stimulează celula să producă (3) și să elibereze (4) numeroși receptori identici (anticorpi).

care se poate lega specific. În felul acesta, celulele respective ar fi stimulate să producă numeroase molecule specifice de tipul catenelor laterale, care, eliberate în sînge, s-ar comporta ca anticorpi.

Teoria este surprinzătoare cel puțin prin două elemente valabile și în prezent: 1) existența unor structuri moleculare (catenele laterale)

pe suprafaţa celulelor, echivalente receptorilor celulari preformaţi, cu structură complementară faţă de antigene ; 2) ideea că specificitatea imunologică este corelată cu configuraţia tridimensională a moleculei de anticorp.

Descoperirea capacităţii organismelor de a produce anticorpi faţă de o gamă practic nelimitată de antigene naturale, dar şi faţă de cele mai noi şi inedite substanţe chimice sintetizate artificial a determinat o îndepărtare de ideea de selecţie, în favoarea teoriilor instructive, după care antigenele ar conţine un component ce dirijează sinteza anticorpilor.

Ideile lui Ehrlich au fost preluate de Jerne abia în anul 1955, prin teoria selecţiei naturale, după care anticorpii corespunzători tuturor specificităţilor posibile sînt formaţi, în mod normal, în organismul vertebratelor şi eliberaţi în cantităţi mici de sînge. Rolul antigenelor pătrunse în circulaţie ar fi de a selecţiona şi reacţiona cu anticorpul corespunzător determinanţilor lor. Complexele formate sînt fagocitate de celulele specializate, determinîndu-le să se multiplice şi să sintetizeze noi molecule de acelaşi tip. După ce antigenul şi-a îndeplinit acest rol de „purtător selectiv", funcţia sa încetează, celulele producătoare de anticorpi continuînd sinteza acestora, sub impulsul unor mecanisme intrinsece. După eliminarea antigenelor, sinteza anticorpilor scade şi producerea acestora „se normalizează". Teoria presupune, deci, sinteza şi secreţia anticorpilor înainte şi după introducerea antigenelor.

Ulterior, Nossal (1958) şi separat Lederberg (1958) au confirmat ipoteza lui Talmage (1952), arătînd că plasmocitele sînt celule specializate să producă un singur tip de anticorp omogen. Ei au stabilit regula „o celulă — un anticorp", cu ajutorul unor experienţe concepute pentru a o infirma.

În anul 1958, Burnet a propus teoria selecţiei clonale a imunităţii dobîndite, menită să adapteze datele referitoare la anticorpogeneză într-un concept unitar, adecvat progreselor înregistrate în acest domeniu. Conform noii teorii, fiecărui antigen îi corespunde în organism o subpopulaţie (clonă sau familie) de celule, capabile să reacţioneze specific în prezenţa lui. Această posibilitate este asigurată de faptul că fiecare celulă a clonei poartă pe suprafaţă anticorpi specifici capabili să recunoască antigenul. Rolul antigenului ar fi de a selecţiona clona corespunzătoare, de a se lega de „receptorii" de pe suprafaţa celulelor ei şi de a amorsa proliferarea, diferenţierea şi sinteza unui număr mare de „receptori" identici (fig. 165).

Burnet considera că imensa diversitate a limfocitelor are la bază mutaţiile apărute cu o mare frecvenţă în cursul vieţii fetale, cînd se realizează şi toleranţa imunologică, prin eliminarea clonelor de celule care au interacţionat cu antigenele proprii (autoantigenele). El concepea răspunsul imun ca integrat unui microcosmos darwinian, în care celulele ce produc anticorpi, ca şi organismele dintr-un ecosistem sînt supuse la mutaţii şi selecţii în care cele mai adaptate supravieţuiesc şi se multiplică (adaptarea implică *ad litteram*, în acest caz, „potrivirea" dintre antigen şi anticorp). Conceptul de selecţie clonală se aplică deopotrivă celulelor T şi B, dar este mult mai clar definit pentru limfocitele B.

Argumente în favoarea teoriilor selective. În ansamblu, teoriile selective au furnizat răspunsul virtual pentru toate criticile aduse teoriilor instructive, pe baza următoarelor argumente :

1) Secvența aminoacizilor în diferitele molecule de anticorpi este diferită. Aceasta corespunde unor diferențe în structura genelor care îi codifică, deci specificitate de control genetic. Chiar unele catene ale proteinelor de mielom pot prezenta variabilitate mare în secvența extremității NH_2 terminale atît pentru catenele C, cît și pentru cele V.

2) Absența antigenelor din plasmocite, probată cu ajutorul antigenelor marcate radioactiv sau fluorescent, demonstrează lipsa participării lor ca matriță sau mulaj.

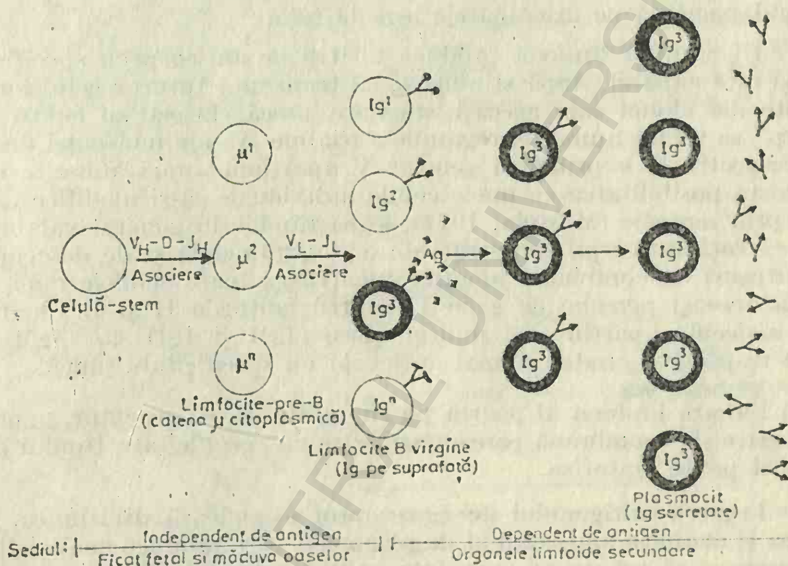


Fig. 165. — Selecția clonală. Celulele-stem din organele limfoide primare produc prin diferențiere (în absența antigenului) celule B virgine, care poartă Ig pe suprafață. După migrare în splină și în ganglionii limfatici, celulele B vin în contact cu antigenul, care induce proliferarea, diferențierea și maturarea la plasmocite, ce produc Ig caracteristice subpopulației celulare respective (după Alt, Blackwell și Yancopoulos, 1987).

3) Informația purtată de structura primară a catenelor este suficientă pentru plierea lor și realizarea structurii secundare și terțiare caracteristice. Desfacerea legăturilor —S—S— și deplierea IgG, prin tratare cu guanidină, distrug practic structura secundară a moleculelor. Îndepărtarea guanidinei prin dializă și reoxidarea restabilesc structura spațială, *in vitro*, în absența antigenului.

4) Creșterea exponențială a numărului anticorpilor după contactul cu antigenele rezultă nu numai din viteza mare de sinteză, ci și din proliferarea exponențială a celulelor producătoare de anticorpi.

5) După ce mecanismul de activare a fost declanşat, antigenul nu mai este necesar pentru a asigura producerea de anticorpi.

6) Capacitatea de legare a anticorpilor devine progresiv mai bună în cursul răspunsului imun, pentru că antigenele „selecţionează" pentru multiplicare celule care poartă mutaţii genice ce stimulează o mai bună „potrivire" antigen — anticorp.

7) Răspunsul secundar este mai rapid şi mai intens pentru că implică un număr mai mare de celule decît cel determinat de un stimul antigenic primar.

8) Toleranţa imunologică este determinată de inactivitatea unei întregi clone. Ea poate apărea înainte de naştere sau puţin după, dacă un antigen copleşeşte capacitatea metabolică a celulelor respective.

Concepţia actuală asupra bazelor moleculare ale anticorpogenezei este fundamentată pe următoarele legi de bază:

1) Un anumit limfocit produce un tip de anticorp cu specificitate unică şi este capabil, după stimulare, să transmită tuturor celulelor descendente ale clonei sale aceeaşi angajare unică. Legea „o celulă — un anticorp" se referă numai la regiunile variabile (V) ale moleculei de anticorp, respectiv la exprimarea genelor V aparţinînd unei anumite clone. Deşi există posibilitatea ca unele celule individuale să-şi modifice „angajarea" prin mutaţie (Milstein, 1974), legea rămîne în general valabilă, în sensul că toţi anticorpii sintetizaţi de o singură celulă şi de descendenţii ei au situsuri de combinare identice, pentru că toate celulele unei clone exprimă aceeaşi pereche de gene V pentru lanţurile H şi L. Chiar cînd aceste molecule aparţin mai multor clase (IgM şi IgD sau IgM/IgG), celulele respective produc numai anticorpi cu specificitate unică.

2) Fiecare limfocit B poartă pe suprafaţa sa, ca receptor, molecule de Ig legate de membrană corespunzătoare ca specificitate tipului de Ig pe care îl poate sintetiza.

3) Legarea antigenului de Ig-receptor stimulează diviziunea, diferenţierea şi evoluţia spre stadiul de plasmocit care produce acelaşi tip de Ig-anticorp ca şi cel de pe suprafaţa celulei parentale. Anticorpogeneza apare deci ca un proces în care antigenul selectează şi stimulează anumite celule să producă mari cantităţi de Ig cu specificitate identică celor produse anterior, numai ca Ig de membrană.

4) Informaţia necesară pentru sinteza anticorpilor este prezentă în structura genetică a celulelor respective. Potenţialul enorm de diversitate este rezultatul organizării genetice particulare sub formă de minigene multiple ($\sim$ 1 000), ce pot fi rearanjate prin mecanisme complexe (legare combinatorială, flexibilitate joncţională, mutaţii punctiforme) (Tonegawa, (1984) (vezi cap. „Genetica diversităţii anticorpilor").

5) Producerea unei game foarte largi de anticorpi diferiţi este consecinţa unei diversităţi egale a celulelor formatoare de anticorp. Ca urmare, sistemul imunitar este format dintr-un număr foarte mare de subpopulaţii (clone) de celule reactive la antigene, fiecare angajată să facă sinteza unui anumit tip de anticorp, cu o specificitate unică.

6) Datorită naturii substanțelor antigenice care sînt multivalente (poartă mai mulți determinanți antigenici), răspunsul imun este aproape invariabil multiclonal, în sensul că este realizat de mai multe clone de limfocite B, care produc anticorpi specifici pentru diferiți determinanți ai aceluiași antigen.

Biosinteza imunoglobulinelor

Sinteza catenelor L și H ale Ig, ca și asamblarea lor au loc în aceeași celulă, reprezentată de plasmocit. Sinteza celor două tipuri de catene este controlată genetic și reglată de gene distincte localizate pe cromosomi diferiți (fig. 166), care sînt transcrise la molecule distincte de ARNm pentru catenele H și L. Ea are loc la nivelul poliribosomilor legați de membrana granulară a reticulului endoplasmatic. Numărul ribosomilor din structura acestora variază în funcție de lungimea moleculelor de ARNm. Pe baza unor date experimentale *, se apreciază că ARNm pentru catena L (213 AA) ar lega 7—8 ribosomi, iar cel pentru catena H (450 AA), 14—15 ribosomi.

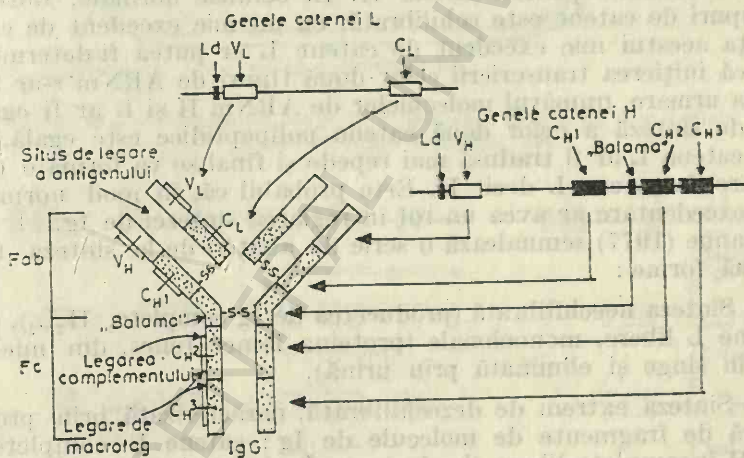


Fig. 166. — Structura unei molecule de IgG și a genelor care o codifică. Săgețile marchează corespondențele dintre diferitele segmente ale ADN și diferitele domenii pe care le codifică. Secvența leader (Ld) este îndepărtată imediat după sinteză și nu apare în molecula matură de Ig.

Izolarea și caracterizarea ARNm pentru catena L a arătat că el are 1 200 nucleotide, deci aproximativ cantitatea dublă necesară pentru codificarea ei. Această particularitate se explică prin prezența unor secvențe excedentare, situate la extremitățile 3′ și 5′, corespunzînd secvenței poliA (~ 200 nucleotide) și alteia de 350 nucleotide cu rol necunoscut.

---

* Doi ribosomi adiacenți în polisom sînt reuniți de un segment de ARNm lung de 90 de nucleotide, ceea ce corespunde la 30 de aminoacizi.

Exprimarea genelor pentru imunoglobuline

Hood şi colab. (1984) au urmărit etapele sintezei IgM după rearanjările genetice produse în cursul dezvoltării celulelor Bμ. Ele urmează, în general, mecanismul caracteristic sintezei proteinelor în celulele eucariote (fig. 167), cu următoarele aspecte succesive. Genele rearanjate (fig. 168 A, B) sînt iniţial transcrise la ARN nuclear (ARNn), care este poliadenilat la extremitatea 3′ de ARN-polimeraza II, în timp ce la extremitatea 5′ are legat un nucleotid guanilic printr-o legătură 5′-5′-trifosfat orientată invers (fig. 168 C). ARNn funcţionează ca ARN premesager. După îndepărtarea intronilor, prin clivare enzimatică şi reunirea exonilor, se formează ARNm matur (fig. 168 D), în care diferitele segmente genetice sînt în continuitate. Datorită presecvenţei „leader" hidrofobe, N-terminale, a ARNm, complexul ARNm — ribosom este legat de membrana reticulului endoplasmic rugos, unde are loc traducerea lui (fig. 168 E). Catenele în curs de formare traversează membrana, pentru ca imediat ce ajung în lumenul RER secvenţele „leader" de 18 AA să fie îndepărtate prin degradare proteolitică (fig. 168 F), înainte de asamblarea moleculei de Ig. Aceste secvente suplimentare ar avea rol în reglarea sintezei, acţionînd probabil ca secvenţe de legare a ribosomilor de reticulul endoplasmatic.

Durata sintezei este apreciată la ~ 30 secunde pentru catena L şi ~ 60—70 secunde pentru catena H. În celulele normale, sinteza celor două tipuri de catene este echilibrată, cu un mic excedent de catene L. Prezenţa acestui mic excedent de catene L ar putea fi determinată de faptul că iniţierea transcrierii celor două tipuri de ARNm s-ar face sincron. Ca urmare, numărul moleculelor de ARNm H şi L ar fi egal. Cum viteza de sinteză a celor două catene polipeptidice este egală, ARNm pentru catena L ar fi tradusă mai repede şi final se va forma o cantitate mai mare de catene L decît H. Este probabil că, în mod normal, catenele L excedentare ar avea un rol în reglarea sintezei de Ig.

Unanue (1977) semnalează o serie de abateri de la sinteza normală, sub două forme :

1) Sinteza neechilibrată (producerea de Ig complete, H_2L_2), asociată cu catene L libere, monoclonale (proteina Bence-Jones, din mielom, eliberată în sînge şi eliminată prin urină).

2) Sinteza extrem de dezechilibrată, caracterizată prin producerea exclusivă de fragmente de molecule de Ig : catene L complete libere, catene H incomplete libere (boala lanţurilor grele („Heavy chains disease") sau jumătăţi de molecule (H — L).

Asamblarea moleculelor de imunoglobuline. Catenele L şi H disponibile în plasmocit sînt asamblate într-o structură tetrapeptidică avînd formula H_2L_2, care reprezintă stadiul unic al Ig monomere (IgG, IgD şi IgE). În cazul IgA şi IgM, asamblarea este urmată de polimerizarea la dimere şi, respectiv, pentamere. Asamblarea are loc foarte repede după eliberarea din polisomi. Etapele esenţiale ale asamblării necovalente şi totalitatea asamblării prin legături covalente au loc în cisternele ergastoplasmice.

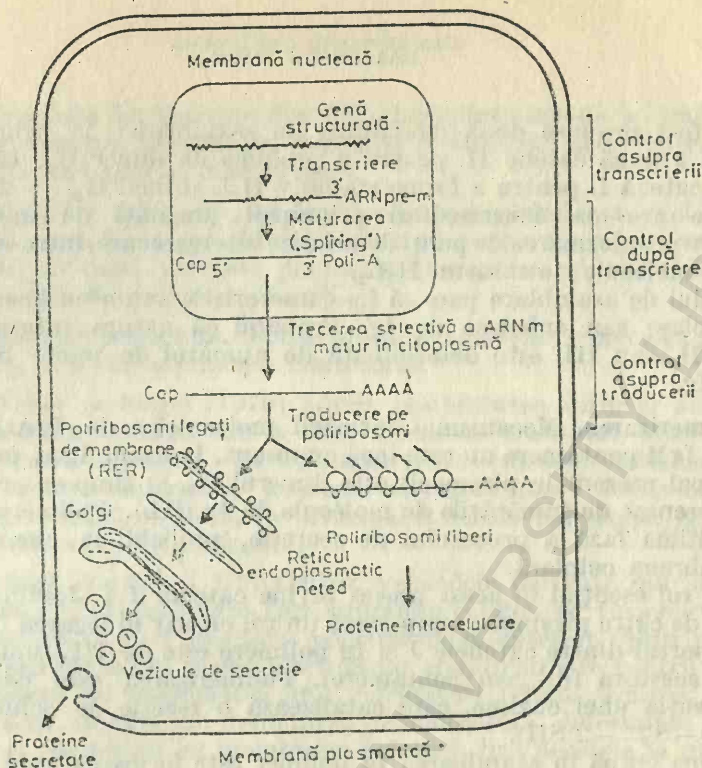


Fig. 167. — Principalele etape în exprimarea unei gene într-o celulă eucariotă (după Campbell, 1984).

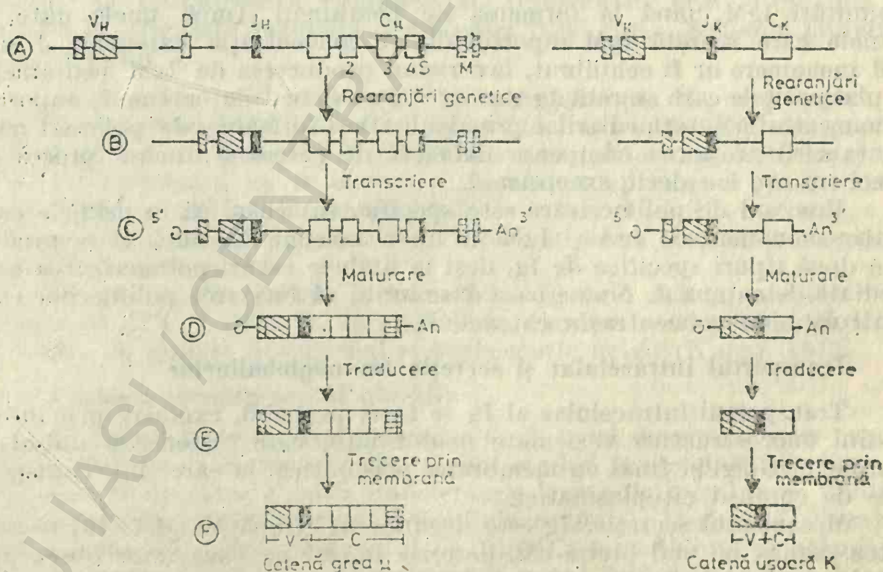


Fig. 168. — Exprimarea genelor pentru catenele grele și ușoare ale Ig în celulele Bμ. Rearanjările genetice au loc în cursul dezvoltării celulelor Bμ. Pentru simplificare a fost reprezentat numai un singur segment de genă de fiecare tip (după Hood și colab., 1984).

Au fost propuse două modalități de asamblare: 1) prima constă în legarea a două catene H, pentru a produce un dimer H_2, căruia i se adaugă o catenă L pentru a forma succesiv H_2L și final H_2L_2; 2) a doua, modalitate are ca intermediari principali jumătăți de molecule de Ig HL, care prin formarea de punți disulfidice intercatenare, între catenele H formează molecule tetramere H_2L_2.

Modul de asamblare pare să fie caracteristic anumitor specii și unei anumite clase sau subclase de Ig. Probabil că natura intermediarului principal H_2 sau HL este determinată de numărul de punți S—S între catenele Ig.

Polimerizarea. Mecanismul formării moleculelor de IgA dimere și a celor de IgM pentamere nu este încă cunoscut. În cazul IgA, intermediarul principal prezent în plasmocit este dimerul H_2, în timp ce pentru IgM ar fi reprezentat de jumătățile de molecule de Ig (HL). Polimerizarea s-ar face în ultima fază a procesului de secreție, probabil în cursul trecerii prin membrana celulară.

Un rol esențial în acest proces revine catenei J („Joining") sintetizată tot de către plasmocit, care joacă un rol efectiv în legarea Ig monomere. Raportul dintre catenele J și Ig polimere este de 1/1, indiferent de mărimea acestora (di- sau pentamere). Polimerizarea este condiționată de intervenția unei enzime, care catalizează o reacție de schimb disulfidic ($-S-S \rightleftarrows -2\,SH$).

Prima etapă în asamblarea Ig polimer este formarea unui dimer cu ajutorul catenei J. Procesul de polimerizare este stopat în stadiul de dimer pentru IgA, care nu poate forma, decît excepțional, polimeri mai mari (tri- sau tetramere), și continuă în cazul IgM, prin asocieri necovalente de subunități IgM, pînă la formarea de pentameri. După unele date, în celulele care secretă IgM raportul dintre concentrația catenelor J și a IgM monomere ar fi echilibrat, favorizînd producerea de IgM pentamere. În plasmocitele care secretă IgA ar exista un deficit de catene J, raportat la concentrația intermediarilor principali. Deși formarea de polimeri mari (pentameri) ar putea compensa deficitul de catene J, acest proces de obicei nu are loc decît excepțional.

Procesul de polimerizare este specific, în sensul că în celulele care conțin monomeri de IgA și IgM nu apar molecule hibride, ci se produc cele două tipuri specifice de Ig, deși în ambele cazuri polimerizarea este mediată de catena J. Numeroase date arată că formarea polimerilor este controlată de concentrația catenei J.

Transportul intracelular și secreția imunoglobulinelor

Transportul intracelular al Ig se face, probabil, exclusiv prin intermediul unor structuri veziculare neoformate, care fuzionează inițial cu complexul Golgi și final cu membrana plasmatică, la care sînt transportate de curenții citoplasmatici.

Mecanismul secreției Ig este necunoscut. După Mandel (1979) s-ar putea realiza pe mai multe căi, descrise inițial pe baza unor observații de ultrastructură, făcute de Pallay (1958):

1) Secreția holocrină este determinată de liza celulei, urmată de eliberarea anticorpilor. Deși microscopia a evidențiat prezența unor vacuole

mari, care conţin Ig, derivate din RE, şi tendinţa lor de a conflua, de a determina ruperea membranei celulare şi citoliză, acest mecanism nu pare să fie nici unic şi nici normal.

2) Secreţia apocrină s-ar realiza prin desprinderea unei părţi din citoplasmă, care lezată ar elibera anticorpii conţinuţi în cisterne. Procesul, descris în două variante denumite clasmatoză şi microclasmatoză, este contestat de unii cercetători.

3) Secreţia merocrină, reprezentată de secreţia Ig pe calea granulelor de rezervă, este de asemenea contestată.

4) Neher şi Siegel (1970) admit posibilitatea difuziei anticorpilor prin membrana celulară sau a unei forme de transport activ, care ar asigura trecerea în mediul extern. Singer (1974) consideră însă acest mecanism ca teoretic imposibil, deoarece trecerea unor molecule hidrofile printr-o membrană celulară, în principal lipidică, hidrofobă, necesită un consum prea mare de energie.

5) După Zagury şi Uhr (1970), veziculele derivate din complexul Golgi, pline cu IgG, ar migra spre suprafaţa celulei, ar fuziona cu membrana celulară şi şi-ar descărca conţinutul la exterior, prin pinocitoză inversă. Deşi nu există probe morfologice convingătoare pentru existenţa acestui proces la plasmocite, unii cercetători admit secreţia printr-un proces similar, descris sub denumirea de emiocitoză, determinat de unirea membranei vacuolelor cu membrana celulară, liza acesteia la punctul lor de contact şi golirea conţinutului la exterior.

În cazul sIgA, procesul de secreţie este asociat cu legarea de componentul secretor (CS), cu rol de receptor, sintetizat de celulele epiteliale, urmată de interiorizarea complexului, transportul prin citoplasmă şi secreţia la suprafaţa luminală a mucoasei (vezi cap. „Sistemul imunitar al mucoaselor”).

Controlul secreţiei anticorpilor este necunoscut. Nu se ştie prin ce mecanism, imunoglobulinele, care reprezintă numai 10—40% din proteinele sintetizate de plasmocite, formează cvasitotalitatea moleculelor secretate. De asemenea, nu se cunoaşte mecanismul prin care plasmocitele normale fac o sinteză cvasiechilibrată de catene L şi H, în timp ce în plasmocitomul malign (mielomul multiplu) au loc o sinteză şi o secreţie excesivă a catenelor L.

Durata medie globală a tranzitului Ig prin celulă este de ~ 90 minute, la 37°C. Catena L, spre exemplu, rămîne ~ 60 minute, în RER şi ~ 20—30 minute în reticulul endoplasmatic neted (Knopf, 1973).

Legarea componentului glucidic

În cursul transportului catenelor de la locul de sinteză spre suprafaţa celulei, pe calea complexului Golgi, are loc procesul de glicolizare a catenelor H de către glicozil transferazele legate de membrane. Componentul glucidic al Ig conţine N-acetilglucozamină, D-glucoză, D-galactoză, D-manoză, L-fucoză şi acid sialic. Iniţial, s-a considerat că adăugarea lor s-ar produce cînd catenele polipeptidice sînt încă legate de polisomi. În prezent este demonstrat că adiţia are loc secvenţial, în funcţie de localizarea glicoziltransferazelor în diferitele fracţiuni subcelulare.

Procesul este inițiat prin legarea covalentă (legătură N-glicozidică) a N-acetil-glucozaminei de resturile de asparagină din structura catenei H. El are loc imediat după ce catenele sînt eliberate de pe polisomi în cisterna ergastoplasmică. D-manoza este adăugată puțin mai tîrziu (în cisternă sau în complexul Golgi). Glucoza și galactoza sînt adăugate ulterior, probabil în parte în complexul Golgi, iar restul în veziculele de origine golgiană (fig. 169). În sfîrșit, fucoza și acidul sialic sînt atașate în momentul cînd moleculele de Ig părăsesc celulele în care s-au format. Secvența adiției de zaharuri specifice reflectă, în mod evident, distribuția glicoziltransferazelor în diferitele fracțiuni subcelulare.

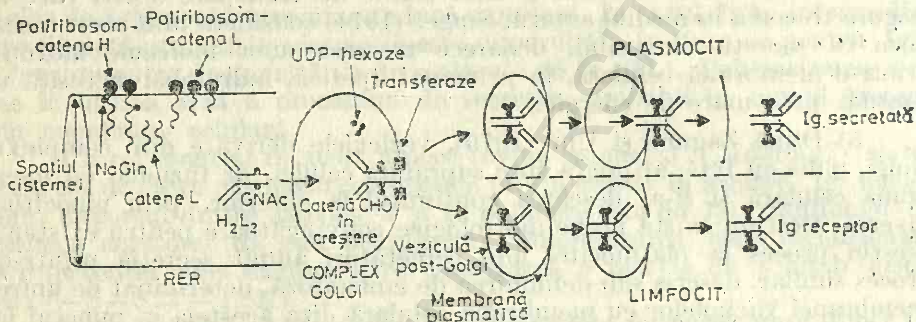


Fig. 169. — Reprezentare schematică a căilor de biosinteză a IgM secretate și de membrană.

Particularitățile imunoglobulinelor sintetizate

Cercetări experimentale de mare finețe au demonstrat că fiecare plasmocit sintetizează anticorpi aparținînd unei clase și subclase unice de Ig, precum și unui tip unic de catene L și H, deci imunoglobuline avînd același izotip, alotip și idiotip. Există o singură excepție de la această regulă, întîlnită, după cît se pare, în cursul răspunsului imun primar, în etapa de comutare a clasei de Ig (spre exemplu, de la IgM la IgG). Ea are o scurtă perioadă de tranziție, cînd unele plasmocite produc simultan ambele clase de Ig. La indivizii heterozigoți pentru un alotip specific de Ig, în ser există ambele alotipuri, însă plasmocitele individuale prezintă fenomenul de excludere alelică, datorită căreia fiecare plasmocit produce numai un singur alotip. Acest comportament sugerează, după Eisen (1976), că în cursul diferențierii celulelor B imunocompetente ar interveni un mecanism care determină supresia uneia din genele de alotipie.

În sfîrșit, fiecare plasmocit produce anticorpi cu o singură specificitate. În cazul imunizării cu un amestec de antigene, cu antigene monovalente sau cu determinanți antigenici multipli pe aceeași moleculă, fiecare plasmocit individual produce anticorpi numai pentru un singur determinant antigenic.

Mecanismul molecular al sintezei imunoglobulinelor secretate sau legate de membrane

A fost în mod deosebit studiat cu IgM, care este produsă sub două forme: 1) IgM monomeră, cu funcție de receptor de antigen, legată de membrana celulelor B și 2) IgM pentameră, care este secretată în mediu. Unitățile de bază ale celor două tipuri de molecule se deosebesc prin prezența unei „cozi", formată din 41 de aminoacizi hidrofobi, necesară pentru ancorarea IgM în membrană sau, respectiv, a unei regiuni carboxiterminale de 20 de aminoacizi hidrofili, care facilitează trecerea prin membrane a formei secretate.

În celulele embrionare există un singur locus genetic pentru regiunea constantă Cµ a catenei H, alcătuit din 4 segmente principale separate (Cµ1 — Cµ4) și două segmente (exoni) mai mici, Cµ m1 și Cµ m2, situate la ~ 1 850 pb de capătul 3' al genei Cµ4, care codifică „ancora" moleculelor de IgM membranare. Porțiunea terminală a IgM secretate este codificată de un segment scurt, adiacent domeniului Cµ4, notat µs (fig. 170).

Asamblarea diferitelor subunități componente ale regiunii Cµ se realizează după transcrierea la ARN pre-mesager, prin mecanisme de clivare — înnădire („Splicing"), favorizate de prezența la extremitățile fiecărui intron a unor situsuri sau semnale de înnădire („Splice signals")

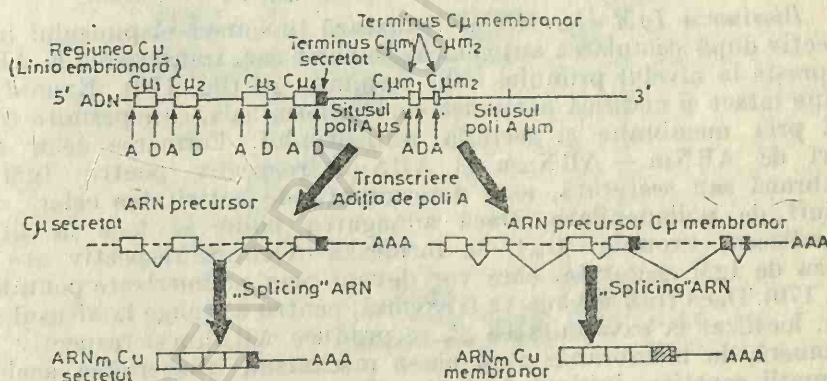


Fig. 170. — Model schematic pentru producerea formelor distincte de IgM secretate (sIgM) sau membranare (IgMm) de la o singură regiune constantă. Genele ce codifică cele patru domenii Cµ sînt mărginite, de situsuri, donator (D) și acceptor (A), care permit îndepărtarea exactă a intronilor. Cele două tipuri de IgM rezultă din terminarea transcrierii la situsuri terminus diferite (Cµs sau Cµm), care creează situsuri alternative de poliadenilare. Rezultă molecule de ARNm care poartă secvența de secreție (Cs) sau de membrană (Cµm) (după Korsmayer și Waldman, 1984) (— — regiuni îndepărtate din ARN pre-m).

acceptoare (A) sau donatoare (D), care mărginesc fiecare exon. În structura regiunii genetice C există, de asemenea, două situsuri alternative de poliadenilare, situate de fiecare parte a perechii de exoni Cµ m1 și Cµ m2 care codifică „ancora" hidrofobă ce leagă IgM de membrana celulară. Primul situs, denumit situsul poli Aµ s, adiacent exonului Cµ 4,

este activ cînd se formează IgM secretate ; cel de-al doilea, situat spre extremitatea 3', după exonul Cμ m2, denumit situsul poli Aμ m, este activ cînd celula produce IgM legate de membrane.

Sinteza IgM monomeră (membranară) are loc și înainte de contactul cu antigenele și se realizează astfel : după transcrierea la o moleculă de ARN premesager (precursor ARN), intervine un proces de clivare — reunire, localizat la granița dintre exonii Cμ4 și μs (fig. 170). Clivarea la acest situs și la nivelul situsului acceptor A, situat de partea 5' a exonului Cμ m1, determină deleția segmentului S al genei structurale (caracteristic formei secretate) și este urmată de reunirea segmentului Cμ4 cu segmentele terminale Cμm. Prezența celor doi exoni 3' terminali, μm1 și μm2 stopează transferul catenelor Hμ și le ancorează în membrană. Ca urmare, ele rămîn legate de membrana RER, cu situsul de legare a antigenului format împreună cu catena L spre lumenul acestuia. Moleculele de IgM din RE sînt transportate spre suprafața celulei prin cicluri repetate de formare de vezicule și fuziuni, care duc inițial la complexul Golgi și final la membrana plasmatică. Pe întreg parcursul acestui transport intracelular situsurile de legare a antigenului se găsesc din punct de vedere topologic într-un spațiu extern, deoarece nu vin în contact cu citoplasma. Transportul este condiționat printr-un mecanism necunoscut de prezența catenelor L funcționale. În celulele pre-B, care nu pot forma catena L, transportul catenelor grele (H) este blocat în celulă, într-o etapă necunoscută, astfel încît ele nu ajung niciodată la suprafața acesteia.

Biosinteza IgM secretate se realizează în cursul răspunsului imun, respectiv după stimularea antigenică. În acest caz, transcrierea la ARNm se oprește la nivelul primului situs terminus μS (fig. 170). Exonul Cμ4 rămîne intact și codifică porțiunea carboxiterminală, care permite transferul prin membrane și secreția anticorpului. Formarea celor două tipuri de ARNm — ARNμm și ARNμS, respectiv pentru IgM de membrană sau secretată, este determinată de activitatea celor două situsuri de poliadenilare. Dacă adăugarea poliA se face la situsul μS, adiacent exonului Cμ4, se formează ARNμS, respectiv are loc sinteza de IgM secretate, care vor deveni prin polimerizare pentamere (fig. 170). Dacă transcrierea va fi extinsă, pentru a ajunge la situsul poli Aμm, localizat la extremitatea 3', se produce ARNμm și respectiv IgM monomeră, de membrană. Prin acest mecanism, transcrierea aceleiași informații genetice, inițiată de la un situs genetic unic, și intervenția unor modalități alternative de clivare și înnădire („Splicing") a ARN premesager produc două polipeptide structural și funcțional diferite. Existența celor două forme de IgM reprezintă încă o expresie a diversității anticorpilor.

Comutarea izotipului imunoglobulinelor secretate

Celulele B imature pot sintetiza și exprima pe suprafața lor molecule de IgMm. Ulterior, ele pot sintetiza și molecule de IgD, a căror sinteză este codificată, pentru regiunea constantă (C) a catenelor grele (H), de determinanți genetici situați imediat în aval, în așa fel încît celulele vor deveni IgM^+/IgD^+. În cursul biosintezei proteinelor, unele celule din componența clonelor de limfocite B suferă o schimbare a izo-

tipului de lanț greu pe care îl pot sintetiza, devenind producătoare de IgG, IgA sau IgE.

Comutarea izotipului („Isotype switching") se poate realiza prin două mecanisme:

1) Comutarea secvențială se realizează în ordinea așezării genelor C_H pe cromosom;

$$C\mu \rightarrow C\delta \rightarrow C\gamma 3 \rightarrow C\gamma 1 \rightarrow C\alpha 1 \rightarrow C\gamma 2 \rightarrow C\gamma 4 \rightarrow C\epsilon \rightarrow C\alpha 2.$$

2) Comutarea directă are ca punct de plecare limfocitul B imatur, care poartă pe suprafață molecule receptor de IgMm.

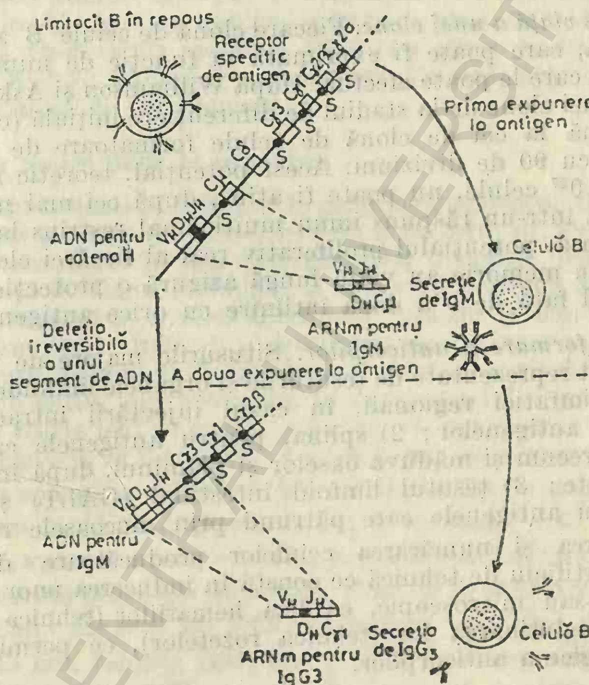


Fig. 171. — Mecanismul comutării izotipului Ig. Prezența secvenței de comutare S permite oricărui segment ce codifică o regiune constantă a catenei H (cu excepția Cδ) să se combine cu secvența $V_H D_H J_H$. Schema prezintă comutarea de la IgM la IgG_3 caracteristică reexpuneri la același antigen (Rougeon, 1985).

În cursul procesului de maturare, această celulă-pivot poate suferi comutări izotipice ce pot duce la producerea de plasmocite capabile să sintetizeze Ig, aparținînd oricăror alte clase sau subclase (fig. 171). Celulele B care au suferit comutări ale clasei de Ig continuă să exprime aceleași gene variabile, atît pentru catenele L, cît și pentru H, astfel încît specificitatea pentru antigene nu este alterată, exceptînd cazul unor modificări de natură mutațională care afectează genele V.

Avantajul biologic major al comutării este determinat de producerea unor anticorpi cu aceeaşi specificitate, dar cu un spectru de activităţi biologice diferite. Procesul de comutare are o importanţă fundamentală pentru răspunsul imun. Cea mai evidentă consecinţă este că răspunsul imun precoce (atît în cursul vieţii unui animal, cît şi în cursul răspunsului unei clone individuale) este, în general, de tip IgM, în timp ce răspunsul tardiv este dominat de una sau de mai multe Ig din celelalte clase. Procesul de reglare care controlează exprimarea diferitelor clase de Ig este încă necunoscut. Există probe că în unele cazuri ar exista o populaţie specializată de celule T, care controlează sinteza de IgA sau de IgE, fie determinînd capacitatea unui precursor de a comuta exprimarea la IgA sau la IgE, fie producînd proliferarea şi diferenţierea selectivă a unor celule deja comutate spre această sinteză.

Durata de viaţă a unei clone. Fiecare clonă de celule B are o durată de viaţă finită, care poate fi exprimată în funcţie de numărul maxim de diviziuni pe care le poate efectua. După Williamson şi Askonas (1974), expansiunea unei clone de la stadiul de diferenţiere iniţială (celulă „stem-angajată") pînă la cel de clonă de celule formatoare de anticorpi ar fi echivalentă cu 90 de diviziuni. Acest potenţial, teoretic reprezentînd producerea a 10^{27} celule, nu poate fi atins, după cei mai mulţi autori, de nici o clonă într-un răspuns imun multiclonal restrîns la un animal.

Oricum însă, potenţialul proliferativ real al fiecărei clone şi faptul că celulele B cu memorie au viaţă lungă asigură o protecţie pe termen lung, în special faţă de o a doua întîlnire cu orice antigen străin.

Locul de formare a anticorpilor. Situsurile majore de producere a anticorpilor sînt reprezentate de ţesuturile şi organele limfoide secundare : 1) ganglionii limfatici regionali, în cazul injectării intradermice sau subcutanate a antigenelor ; 2) splina, pentru antigenele care pătrund în circulaţie, precum şi măduva oaselor şi plămînul, după injecţii intravenoase repetate ; 3) ţesutul limfoid intestinal (GALT) şi respirator (BALT), pentru antigenele care pătrund prin mucoasele respective.

Evidenţierea şi numărarea celulelor producătoare de anticorpi recurge la un artificiu de tehnică ce constă în inducerea unor manifestări vizibile, macro-sau microscopic, ca liza hematiilor (tehnica plajelor de hemoliză) sau aglutinarea lor (tehnica rozetelor), ce permit decelarea activităţii biologice a anticorpilor.

Tehnica plajelor de hemoliză. Descrisă independent de Jerne (1958), precum şi de Ingraham şi Bussard (1958), reprezintă o adaptare a tehnicii plajelor de liză produse de bacteriofagi.

Tehnica directă constă în includerea limfocitelor (celule splenice), provenite de la animalul imunizat cu hematii, împreună cu o suspensie densă de hematii de berbec, într-un strat de agar depus pe suprafaţa unei plăci Petri. După incubare, în cursul căreia unele celule sintetizează anticorpi hemolitici ce difuzează în jur, prezenţa acestora este evidenţiată prin adăugarea complementului. Celulele producătoare de anticorpi determină apariţia unor plaje de liză („Plaque forming cells"), vizibile cu ochiul liber, care pot fi numărate. Formarea plajelor este determinată de secreţia anticorpilor, care pare să aibă loc după ~ 30 minute de la

sinteza făcută de către celulele vii. Ea nu are loc în cazul celulelor fixate chimic.

Tehnica directă evidenţiază, în general, numai secreţia de IgM, deoarece liza unei hematii de către sistemul complement necesită legarea unei singure molecule de IgM. După Avrameas, Bach şi Preud'homme (1976), tehnica directă poate evidenţia şi celulele producătoare de IgG, în cursul răspunsului imun secundar, cînd celulele produc mari cantităţi de IgG. În cazul celulelor care produc numai cantităţi mici de IgG, evidenţierea lor este dificilă : liza hematiilor este condiţionată de legarea a două molecule de IgG, iar repartizarea spaţială a receptorilor pe hematii este neadecvată unei astfel de legări eficiente.

Celulele care produc IgG pot fi evidenţiate cu ajutorul tehnicilor de hemoliză indirectă. Acestea implică adăugarea unui ser imun anti IgG polivalent sau a unor seruri specifice diferitelor clase de Ig. Moleculele de anticorpi antiIg se fixează pe moleculele de anticorpi antihematii, favorizînd liza indusă de complement.

Distribuţia anticorpilor în organism

După ce sînt formaţi în splină şi în ganglioni, anticorpii trec în sînge, direct sau indirect pe calea limfaticelor eferente (tabelul nr. 45). Exceptînd anticorpii care trec direct în secreţiile glandelor apocrine, toate Ig ajung în ultimă instanţă în sîngele circulant şi sînt vehiculate de acesta în tot organismul, pătrunzînd la nivelul diferitelor ţesuturi şi organe. Rezerva totală a organismului include deci cantitatea de Ig intravasculară plus cea extravasculară. Schimbul dintre sînge şi ţesuturi variază foarte mult, fiind deosebit de activ, spre exemplu, în cazul peretelui intestinal, lent în cazul pielii şi foarte lent în cazul muşchilor. Se apreciază că în absenţa proceselor inflamatorii, Ig introduse în sînge la om au nevoie de ~ o săptămînă pentru a ajunge la echilibru. Interschimbul dintre sînge şi ţesuturi are loc mult mai rapid cînd permeabilitatea vasculară este mărită, aşa cum se întîmplă, spre exemplu, în cursul proceselor inflamatorii.

Studiile privind proporţia diferitelor clase de Ig prezente la echilibru, în afara circuitului sanguin au arătat existenţa unor deosebiri semnificative. Astfel, la om, valorile IgG, IgA şi IgM extravasculare corespund la 0,55, 0,60 şi respectiv 0,30. Aceste cifre reflectă relativa uşurinţă cu care IgG şi IgA pot trece prin pereţii capilarelor normale, în comparaţie cu moleculele mai mari ale IgM polimere. Concentraţia efectivă a Ig în lichidele extravasculare tisulare variază cu gradul de vascularizaţie al acestora. Ea este de ~ 0,8 ori din concentraţia plasmatică, în cazul cavităţii peritoneale, şi de numai 0,06 în ţesuturile avasculare, cum sînt tendoanele

În mod normal, Ig nu trec sau sînt numai detectabile în lichidul cefalorahidian, datorită reţinerii lor de plexurile coroide şi de vascularizaţia meningeală. IgA şi IgG sînt prezente în secreţiile glandelor exocrine (mucus intestinal, bronhic, nazal, lacrimi, lapte, salivă) şi în acelaşi timp formează un înveliş antiseptic („Antiseptic paint") pe suprafaţa apicală a celulelor glandelor respective.

Tabelul nr. 45

Prezența principalelor imunoglobuline în ser la omul normal, la diferite vîrste (după Stiehm și Fundenburg, 1966)

Vîrsta	Numărul cazurilor studiate	Concentrația medie a IgG		Concentrația medie a IgM		Concentrația medie a IgA		Concentrația globală	
		mg/dL (limite)	% față de adult	mg/dL (limite)	% față de adult	mg/dL (limite)	% față de adult	mg/dL (limite)	% față de adult
Nou-născut	22	1031±200 (645–1244)	89±17	11±5 (5–30	11±5	2±3 (0–11)	1±2	1044±201 (660–1439)	67±13
1–3 luni	29	436±119 (272–762)	37±10	30±11 (16–67)	30±11	21±13 (6–5)	11±7	481±127 (324–699)	31±9
4–6 luni	33	427±180 (206–1125)	37±16	43±17 (10–83)	43±17	28±18 (8–93)	14±9	498–204 (228–1232)	32±13
7–12 luni	56	661±210 (279–1533)	58±19	54±23 (22–147)	55±23	37±18 (16–98)	19±9	752–242 (327–1687)	48±15
13–24 luni	59	762±209 (258–1393)	66±18	58±23 (14–114)	59±23	50±24 (19–119)	25±12	870±258 (398–1586)	56±16
25–36 luni	33	892±183 (419–1274)	77±16	61±19 (28–113)	62±19	71±37 (19–235)	36±19	1024±205 (499–1418)	65±14
3–5 ani	28	929±228 (569–1597)	80±20	56±18 (22–100)	57±18	93±27 (55–152)	47±14	1078±245 (730–1771)	65–17
6–8 ani	18	923±256 (559–1492)	80±22	65±25 (27–118)	66±25	124±45 (54–221)	62±23	1112±293 (640–1725)	71±20
9–11 ani	9	1124±235 (779–1456)	97±20	79±33 (35–132)	80±33	131±60 (12–208)	66±30	1334±254 (966–1639)	85±17
12–16 ani	9	946±124 (726–1085)	82±11	59±20 (35–72)	60±20	48±63 (70–229)	74±32	1153±169 (833–1284)	74±12
Adulți	30	1158±305 (569–1919)	100±26	99±27 (47–147)	100±27	200±61 (61–330)	100±31	1457±353 (730–2365)	10 ±29

Catabolismul imunoglobulinelor

Ca și alte proteine, imunoglobulinele-anticorp sînt permanent degradate și resintetizate în organism. În mod normal, viteza de degradare și cea de sinteză sînt echilibrate, în așa fel încît mărimea rezervei din organism este constantă. Procesul poate fi studiat prin urmărirea activității unui anticorp specific, marcat cu ^{131}I (T 1/2 = 8 zile) sau cu ^{125}I (T1/2 = 57 zile) și/sau prin viteza de eliminare a radioizotopului din sînge sau din organism. Acest fapt este posibil, deoarece după degradarea Ig „marcajul" este pierdut, fie prin dispariția activității specifice, fie prin eliminarea ^{131}I prin urină (fig. 172).

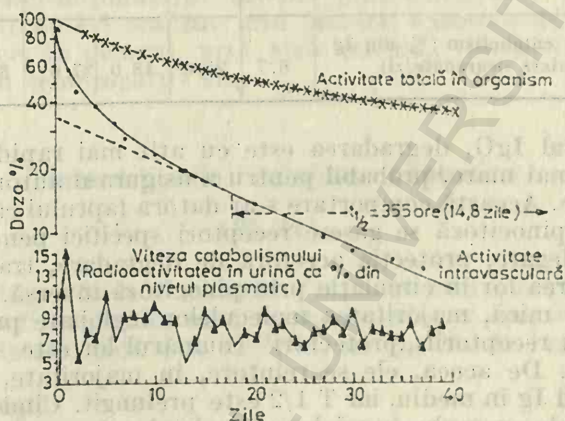


Fig. 172. — Catabolismul IgG la omul normal, după injectarea intravenoasă a unor cantități foarte mici de IgG, marcate radioactiv cu ^{131}I. Graficul prezintă radioactivitatea totală, reținută în organism (curba superioară) și cantitatea de Ig radioactivă din plasmă (curba din mijloc). Datorită iodului liber eliberat zilnic prin catabolismul Ig marcate, radioactivitatea din urină este înregistrată ca procent din cantitatea prezentă în plasmă, în același timp (curba inferioară). Determinările au fost făcute la intervale regulate timp de 38 de zile.

Viteza de catabolism se apreciază prin determinarea timpului de înjumătățire (T 1/2). Ea depinde de clasa și subclasa Ig (tabelul nr. 46). Astfel, T 1/2 pentru IgG1, IgG2 și IgG4 este de 21 de zile, în timp ce pentru IgG3 (probabil datorită conformației sale speciale) este doar de 7 zile.

Catabolismul este influențat de o serie de factori :

1) Metabolismul organismului-gazdă : T 1/2 pentru IgG este cu atît mai îndelungat cu cît animalul este mai mare (4 zile la șoarece, 5 la șobolan, 5,5 la cobai, 6,8 la iepure, 8 la cîine și 10 zile la porc) ;

2) Unele particularități de structură. Astfel, segmentul Fc al catenei grele se comportă ca și molecula de IgG intactă, în timp ce segmentele Fab și catena L au timpul de înjumătățire ~ de 24 de ore.

3) Temperatura scăzută mărește viteza catabolismului, probabil prin intensificarea activității metabolice în general.

Tabelul nr. 46

Proprietățile metabolice și cantitățile diferitelor molecule de Ig în ser (după date din literatură)

Proprietățile (valori medii)	IgG	IgA	gM	IgD	IgE
Viteza de sinteză (mg/kg/zi)	33,0	24,0	6,7	0,4	0,016
Concentrația în ser (mg/ml)	12,0	2,5	0,93	0,023	0,0003
Procentaj intravascular	45,0	42,0	80,0	75,0	51,0
Timp de înjumătățire (T 1/2) (zile)	22,5	5,8	5,1	2,8	2,5
Viteza de catabolism (% din Ig intravasculare degradate/zi)	6,7	25,0	18,0	37,0	89,0

4) În cazul IgG, degradarea este cu atît mai rapidă cu cît concentrația este mai mare, probabil pentru a asigura o autoreglare a concentrației serice. Această comportare s-ar datora faptului că pe suprafața veziculelor de pinocitoză se găsesc receptori specifici pentru IgG, care asigură, după legare, protecția acestora de degradare, transportul prin celulă și revenirea lor în circulație prin pinocitoză inversă. Cînd concentrația IgG este mică, majoritatea moleculelor înglobate prin pinocitoză sînt asociate cu receptorii „protectori" (numărul lor este ~ egal cu cel al receptorilor). De aceea, ele se reîntorc, în majoritate, la suprafața celulei, eliberînd Ig în mediu, iar T 1/2 este prelungit. Cînd concentrația IgG este mare (de exemplu, în mielomul multiplu), în veziculele de pinocitoză sînt înglobate mari cantități de IgG. Deoarece numărul receptorilor este limitat, numai un număr mic de Ig se vor lega de receptori și vor fi protejate. Cele mai multe, rămase în stare liberă, vor fi degradate rapid : T 1/2 este scurtat. Mecanismul, propus de Brambell (1980), explică transferul selectiv transplacentar al IgG.

După unii cercetători, catabolismul este inițiat de o modificare conformațională prealabilă a regiunii Fc a Ig, determinată de uzura metabolică. Ulterior, Ig modificate s-ar lega de membrana celulară a macrofagelor, polimorfonuclearelor, celulelor hepatice și splenice, fiind înglobate prin micropinocitoză. În vezicula de pinocitoză s-ar produce reducerea legăturilor S—S intercatenare de către enzima disulfid reductază. După fuziunea cu lizosomii și formarea pinolizosomilor, ar avea loc hidroliza Ig de către catepsinele lizosomale. Fragmentul Fc rezultat este scindat la Fc′ de catepsinele B și D, iar Fc′ este degradat la peptide de catepsina E. Fragmentele Fab ar fi hidrolizate de catepsinele B, D și E în catena L și segmentul Fd, care, final, sînt degradate la peptide. Ipoteza se bazează, evident, pe posibilitățile de fracționare, cu ajutorul enzimelor lizosomale, demonstrate *in vitro*.

Sediul principal al catabolismului în organism nu este cunoscut. El s-ar realiza ~ 30 % în ficat (în celulele hepatice și în mai mică măsură

în celulele Kupffer) și ~ 15% în epiteliile mucoasei intestinului subțire. Rolul major revine rinichiului, respectiv celulelor tubilor proximali, care captează Ig filtrate prin glomerul și, probabil, celulelor sistemului fagocitar mononuclear.

Catabolismul Ig poate fi crescut (pînă la de 4 ori viteza normală) în cursul infecțiilor prelungite sau repetate, caracterizate prin creșterea nivelului IgG în plasmă; nivelul normal este menținut prin intensificarea sintezei. În mielomul multiplu, viteza catabolismului poate să crească de 8—10 ori. Uneori, creșterea globală a catabolismului poate fi atît de mare, încît resinteza de IgG, care nu este accelerată (uneori este chiar diminuată), nu poate echilibra pierderile. De aceea, aceste stări se însoțesc de un deficit imunitar, caracterizat prin scăderea rezistenței la infecții. Deficitul imunitar produs prin exagerarea catabolismului trebuie deosebit de cel realizat prin pierderi excesive de Ig și de proteine plasmatice, în general, prin piele (arsuri), rinichi (stări nefrotice grave), intestin (enteropatii) etc.

Interacțiunile celulare citotoxice

(Pl. 26)

Citotoxicitatea include ansamblul efectelor nocive asupra unei celule-țintă. Ea poate fi subletală, cînd implică inhibarea creșterii și diviziunii celulelor, sau letală, cînd este însoțită, de regulă, de liza celulei-țintă.

Terminologie

Citotoxicitate: efect dăunător asupra unei celule, indiferent dacă este letal sau nu.

Citostază: tip de citotoxicitate subletală, care determină inhibarea creșterii și diviziunii celulare.

Citoliză: citotoxicitate cu efect letal, ducînd totdeauna la liza celulei-țintă.

Citotoxicitate mediată celular: tip de citotoxicitate, care necesită contactul intim, obligatoriu, între o celulă-țintă (care este lezată sau omorîtă) și una capabilă să producă acest efect (celula efectoare).

Citotoxicitate imună: proces de citotoxicitate determinat de limfocitele T_C sau citolitice.

Citotoxicitate fără contact celular: tip de citotoxicitate care poate fi indus prin modificări fizice și/sau chimice, și prin acțiunea asociată a anticorpilor și a sistemului complement.

Tipuri de celule efectoare citotoxice (tabelul nr. 47).

1) *Limfocitele T citotoxice sau citolitice*: cel mai mult studiate, datorită capacității lor de a recunoaște, cu ajutorul receptorilor de pe supra-

Tabelul nr. 17

Tipurile de citotoxicitate mediate de celule

Tipul de celule	Denumirea fenomenului	Celulele efectoare	Sensibilizarea celulelor efectoare	Specificitate și activitate *	Celulele-țintă	Rolul citotoxicității *in vivo*
IMUNITARE	Liză mediată de celulele T	Limfocite T citotoxice ($Ly\text{-}1^-2^+3^+$)	Selecție clonală, proliferare și diferențiere	Specifică și selectivă	Celule din țesuturi alogenice sau cu self alterat	Omoară celulele infectate cu virusuri, celulele tumorale, alogrefele
	Citotoxicitate mediată de macrofage	Macrofage activate	Limfokine de la celule $T - Ly\text{-}1^+2^-3^-$	Nespecifică (de preferință pentru tumori)	Paraziți intracelulari Celule tumorale	Controlează infecția Inhibă creșterea tumorilor
	Citotoxicitate mediată celular, dependentă de anticorpi	Celule K (Ig^-, $Thy\text{-}1^-$) Monocite Granulocite	Nu există Necesită prezența anticorpilor pe celulele-țintă	Specifică și selectivă	Hematii Celule din țesuturi Agenți patogeni (?)	?
NEIMUNITARE	Citotoxicitate naturală („Natural killing")	Celule NK (Ig^-; Fc^-, $Thy\text{-}1^-$) Celule NC** („Natural cytotoxic")	Nu există	Nespecifică pentru celulele tumorale	Celule tumorale	Controlează creșterea tumorilor Rol antimetastatic
	Citotoxicitate mediată de granulocite	Neutrofile	Nu există. Mult accelerată de prezența anticorpilor sau de C3 pe celulele-țintă	Nespecifică	Bacterii piogene Celule din țesuturi	Controlează evoluția infecției

* Specificitatea se referă la antigenitate; selectivitatea se raportează la efectele asupra celulelor-martor.
** Se deosebesc de NK numai prin diferențe de activitate, față de anumite linii de celule transformate.

fața celulară, un singur tip de celule-țintă, asupra cărora își exercită, în mod specific, efectul.

2) *Celulele NK-ucigașe naturale* („Natural killer"): celule efectoare prezente în mod normal în organism, cu acțiune nespecifică, exercitată asupra unei game largi de celule-țintă, infectate cu virusuri sau tumorale. Acțiunea lor nu este supusă restricției CMHC și nu este condiționată de o expunere prelabilă la acțiunea unui antigen.

3) *Celulele K* („Killer cells"): determină citotoxicitatea mediată celular, dependentă de anticorpi ADCC („*A*ntibody *d*ependent cell mediated cytotoxicity").

4) *Macrofagele și monocitele* indivizilor normali, cu citotoxicitate cu efect lent (48—22 de ore) față de celulele tumorale-țintă (Keller și colab., 1980).

5) *Celulele NC (citotoxice naturale)* („Natural cytotoxic cells"), descrise de Stutman și colab. (1980) la șoarece, prezente probabil și la alte specii.

6) *Granulocitele* indivizilor normali, cu acțiune citostatică pe o gamă largă de celule tumorale.

Este evident că acțiunea asociată a acestor categorii de celule citotoxice are o importanță deosebită pentru supraviețuirea organismelor.

Celulele T citotoxice

Fenomenul de citotoxicitate, cel mai bine cunoscut, este legat de activitatea celulelor T citotoxice (T_C) sau citolitice (TCL), care sînt reprezentative pentru rolul lor efector în procesele de imunitate mediată celular.

Formarea celulelor Tc efectoare

Mecanismul apariției celulelor T_C efectoare a fost studiat, *in vivo*, în special pe modele experimentale, care reproduc respingerea alogrefelor. Celulele T_C pot fi detectate în țesutul respins, în ganglionii limfatici regionali, în splină și în sîngele periferic, de asemenea și în cursul infecțiilor virale, sub formă de celule citotoxice specifice virusului respectiv, activitatea lor fiind mult mai mică decît a celor produse de alogrefe.

O tehnică simplă de obținere a celulelor T_C efectoare, la șoarece, se bazează pe injectarea intraperitoneală a celulelor tumorale de ascită Ehrlich. Celulele T_C pot fi recuperate din lichidul peritoneal, după îndepărtarea macrofagelor, care aderă de suprafețele de sticlă.

Fig. 173 prezintă etapele principale ale dezvoltării răspunsului citotoxic produs de celulele T:

1) Pătrunderea antigenului este sesizată de mai multe subpopulații de celule T, avînd funcții deosebite. Ele poartă molecule de suprafață caracteristice, care fac ca, spre exemplu, celulele care vor sintetiza limfo-

kine să fie diferite, fenotipic și funcțional, de cele din care se vor diferenția celulele T_C.

2) Contactul cu antigenul activează precursorii celulelor T_C, determinînd apariția receptorilor pe suprafața lor pentru o serie de limfokine și, în special, pentru IL-2 (celulele T inactive, în repaus, nu au astfel de receptori).

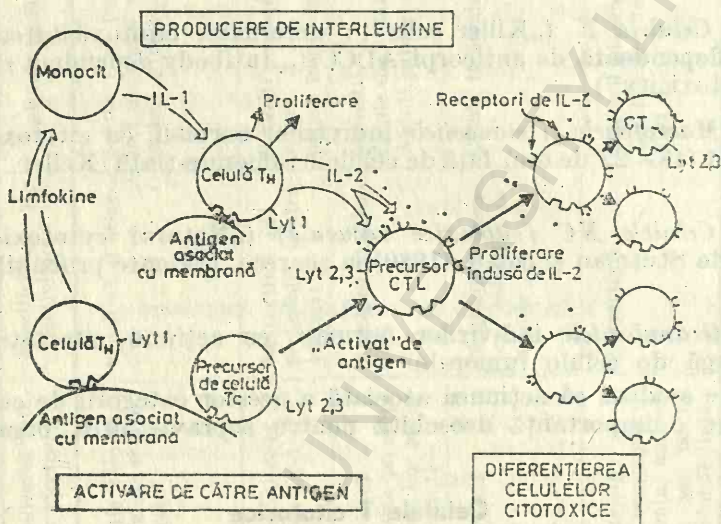


Fig. 173. — Reprezentare schematică a rolului mediatorilor solubili în diferențierea celulelor T citotoxice (după Henney și Gillis, 1984).

3) IL-2 induce proliferarea și probabil diferențierea precursorilor la celule T_C efectoare (Henney și Gillis, 1984). Unele date mai noi, sugerează că apariția potențialului citotoxic la precursorii celulelor T_C, nu necesită proliferarea lor, deoarece capacitatea de a omorî celulele-țintă este o proprietate a cărei apariție precede proliferarea celulară. După cum s-a demonstrat, în cazul respingerii unor grefe alogene, procesul se însoțește constant de apariția unor celule T_C cu memorie, care la un contact ulterior cu aceleași celule-țintă acționează mai rapid și mai intens decît în cursul răspunsului primar.

Mecanismul citolizei mediată de celulele T_C

Bazele moleculare ale citolizei induse de limfocitele T_C sînt încă necunoscute. Ea necesită îndeplinirea unor condiții esențiale (tabelul nr. 48).

După Prendergast (1977), procesul s-ar desfășura în următoarele etape succesive:

1) *Recunoașterea* celulei-țintă și legarea specifică a celulelor T_C, printr-un proces de adeziune puternică. Etapa durează ~ 2 minute și

Tabelul nr. 48

Condițiile obligatorii pentru producerea citolizei mediate de celulele T_C.

Condițiile	Argumentele
Celulă T viabilă	Iradierea X și inhibitorii metabolici suprimă activitatea citolitică
Contact intim cu celula-țintă	Interacțiunile celulelor separate de membrane permeabile sau în medii viscoase nu sînt citolitice. Distrugerea celulei-țintă este riguros specifică
Prezența cationilor bivalenți	Mg^{2+} necesar pentru legarea celulelor Tc de celulele-țintă Ca^{2+} necesar pentru citoliză
Organite secretorii celulare intacte	Substanțele chimice care măresc concentrația AMPc limfocitar inhibă citoliza, prin interferență cu sistemele celulare secretorii

necesită prezența Mg^{2+}. Poate fi blocată cu : anestezice locale, inhibitorii producerii de ATP, citochalazină B, anticorp antițintă și EDTA.

2) *Faza de programare pentru liză*, a loviturii mortale ("lethal hit") numită și „sărutul morții" („kiss of death"), necesită ~ 10 minute. Ea inițiază modificările crescînde de permeabilitate ale membranei față de electroliți. Este foarte dependentă de temperatură (inhibată la <de 4°C, este de 10 ori mai lentă la temperatura camerei decît la 37°C). Necesită Ca^{2+}. Sediul primar al atacului este membrana celulei-țintă, dar aceasta are un rol pasiv. Faza poate fi inhibată de : substanțele active pe AMPc, colchicină, vinblastină și EDTA.

3) *Faza de „umflare" osmotică* este determinată de permeabilitatea crescută a membranei celulelor-țintă, prin exces de influx de apă. Asociată cu pierderea de metaboliți, ea se termină cu liza pasivă a celulei-țintă, consecutivă leziunilor membranare, și eliminarea în mediu a întregului conținut citoplasmatic (fig. 174).

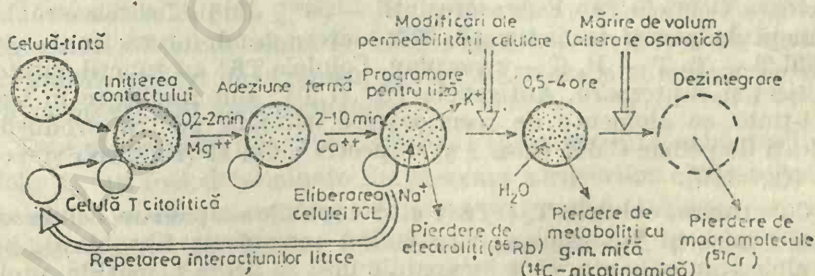


Fig. 174. — Reprezentare schematică a mecanismului clasic de liză mediată de celulele T. Celula killer reia de mai multe ori ciclul de distrugere a celulelor-țintă.

Etapele citolizei au fost urmărite pe microelectronografii de către Abel şi colab. (1970), punind în contact celulele-ţintă din linia LC3H cu celule limfoide provenite de la şoareci BALB/c, imunizaţi anti-LC3H. După ~ 18 ore, limfocitele se măresc, conţin numeroşi ribosomi, au RER puţin dezvoltat. Ele se leagă iniţial de celula-ţintă, prin prelungiri largi, pentru ca, rapid, contactul să se extindă şi să apară sub forma unor interdigitaţii proeminente. O singură celulă-limfoidă se poate lega simultan de mai multe celule-ţintă. Mecanismul lizei nu este elucidat. Sellin şi colab. (1971) sugerează, pe baza transferului bidirecţional de fluoresceină de la o celulă la alta, apariţia unei comunicări intercelulare, în timp ce Koren şi colab. (1973) consideră că membrana celulei-ţintă s-ar rupe, în timp ce cea limfocitară ar rămîne intactă. În sfîrşit, Mandel şi colab. (1974) confirmă prezenţa prelungirilor interdigitate la nivelul zonei de contact între cele două tipuri de celule, nu însă şi rupturile membranare. După ei, liza s-ar datora unor rupturi extrem de fine ale membranei celulelor-ţintă.

Celulele T_C supravieţuiesc partenerului pe care l-au lizat: la sfîrşitul perioadei de programare pentru liză, ele se detaşează, reluînd ciclul de cel puţin trei ori şi, probabil, cel mai adesea, de peste şase ori. Microelectronografiile regiunilor de contact ale celulelor T sugerează necesitatea unor rearanjări active ale membranei celulare după eliberarea lor de celulele-ţintă, evidenţiind, totodată, o acumulare submembranară de microfibrile (Wessels şi colab., 1981). Datorită capacităţii de a repeta ciclurile litice un număr relativ mic de celule T_C poate fi foarte eficient, spre exemplu, în respingerea unei grefe. Celulele apropiate care au rol de „ţintă" nu sînt afectate.

Antigenele celulelor T implicate în citotoxicitate şi citoliză. Natura celulelor-ţintă pentru limfocitele T_C

Citoliza mediată de celulele T_C (TCL) este foarte specifică. Amestecul *in vitro* al celulelor T_C cu ţinta lor specifică şi cu alte celule-ţintă nespecifice are drept urmare distrugerea selectivă a celulelor-ţintă specifice, fără lezarea celor folosite ca martor. Descifrarea structurii antigenelor de pe suprafaţa celulelor T a permis explicarea acestei comportări.

S-a demonstrat că limfocitele $T3^+$ $T11^+$ cuprind două subpopulaţii, care exprimă antigenele $T4^+$ şi $T8^+$, fiecare avînd funcţii unice de reglare şi efectoare. Celulele $T4^+$, care reprezintă ~ 30% din limfocitele circulante, au funcţii helper şi inductor (T_H/Ti), determinînd interacţiuni celulare de tipul T — T, T — B, T — macrofag. Celulele $T8^+$ au funcţii citotoxice (citolitice) şi supresoare. Antigenele $T8^+$ şi $T4^+$ sînt implicate în legarea celulei-ţintă ca elemente de recunoaştere asociată pentru produşii self codificaţi de genele CMH clasa I şi respectiv clasa II (Biddison şi colab., 1982) (fig. 175).

Ca urmare, celulele T_C ($T8^+$) sînt capabile să omoare celule singenice, alogenice şi xenogenice, care includ macrofage, fibroblaşti, limfocite, celule tumorale etc. Sînt incapabile însă să lizeze hematiile, probabil deoarece exprimă numai cantităţi foarte mici de antigene CMH pe suprafaţă sau, poate, datorită unei structuri neobişnuite a membranei celulare.

De asemenea, nu omoară microorganismele, deoarece receptorul T este „orb" față de celule atît de deosebite filogenetic. În plus, ele nu prezintă antigene CMH ce ar putea fi recunoscute sau cu care ar putea reacționa încrucișat.

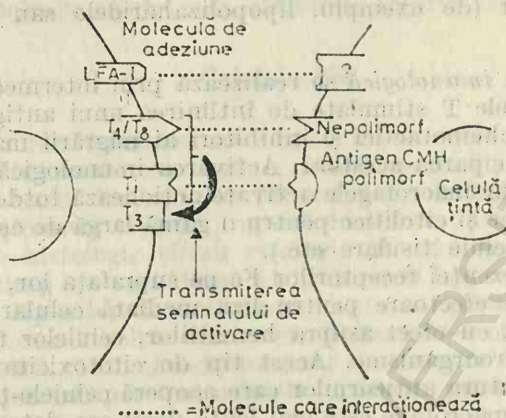


Fig. 175. — Rolul antigenelor de pe suprafața celulelor T în liza celulară. După recunoașterea antigenului străin în asociere cu antigenele self CMH și asocierea celulelor $T4^+$ și $T8^+$ cu moleculele clasa II și respectiv clasa I, activarea indusă de ligand este transmisă în celulă pe calea moleculelor T3 (după Bolhuis, Gravekamp și van der Griende, 1986).

Rolul citotoxicității celulare in vivo

Celulele T_C au un rol esențial în apărarea antivirală. Ele recunosc antigenele virale numai în asociere cu moleculele de clasa I codificate de CMH, fapt care are drept consecință „concentrarea" acestora asupra celulelor infectate, distrugerea lor, împiedicarea replicării și diseminării virusului în organism. În unele cazuri însă, ca, de exemplu, în infecția șoarecilor cu virusul choriomeningitei limfocitare (VCML), acțiunea celulelor T_C poate fi dăunătoare organismului-gazdă, producînd modificări patologice letale.

Limfocitele T_C sînt principalele celule efectoare în respingerea acută a alogrefelor. Sistemul celulei T_C-CMH reprezintă un dispozitiv specializat foarte subtil, utilizat de organism pentru a detecta și elimina orice antigen străin (nonself) sau self-modificat.

Este probabil că apariția și evoluția funcțiilor citotoxice mediate de celulele T_C au fost determinate de prezența virusurilor citopatogene și a antigenelor noi de pe suprafața celulelor tumorale. Acțiunea asociată a celorlalte tipuri de celule citotoxice capabile să distrugă celulele infectate cu virusuri, cuplată cu efectul protector al anticorpilor și interferonilor ar reprezenta factorii esențiali ai protecției față de infecțiile virale.

Citotoxicitatea mediată de macrofage

Macrofagele exercită efecte citotoxice ori de cîte ori sînt activate. Procesul de activare poate fi realizat pe două căi :

1) *Activarea neimunologică* este determinată de diferiţi produşi ai microorganismelor (de exemplu, lipopolizaharidele sau unele substanţe iritante).

2) *Activarea imunologică* se realizează prin intermediul limfokinelor eliberate de celulele T stimulate de întîlnirea unui antigen specific. Ele conţin şi factori chemotactici şi inhibitori ai migrării macrofagelor, ceea ce amplifică participarea acestora. Activarea imunologică este un răspuns riguros specific, dar macrofagele activate acţionează totdeauna nespecific, putînd fi citotoxice şi citolitice pentru o gamă largă de celule (microorganisme, hematii, celule tisulare etc.).

Datorită prezenţei receptorilor Fc pe suprafaţa lor, macrofagele pot servi drept celule efectoare pentru liza mediată celular dependentă de anticorpi (ADCC), cu efect asupra hematiilor, celulelor tumorale şi probabil a unor microorganisme. Acest tip de citotoxicitate este specific, fiind limitat de natura anticorpilor care acoperă celulele-ţintă. Citotoxicitatea mediată de macrofage este mai lentă decît cea determinată de celulele T_C, fiind evidentă după > de 24 de ore. Celula atacată în mod preferenţial este celula tumorală, care este distrusă mai rapid decît celulele normale, probabil datorită modificărilor importante ale suprafeţei celulare.

Citotoxicitatea macrofagelor activate are un rol deosebit de important în controlul infecţiilor produse de microorganisme parazite intracelular (*Mycobacterium*, *Brucella*, *Salmonella* etc.) şi în distrugerea celulelor infectate cu virusuri.

Citoliza mediată de granulocite

Granulocitele pot exercita citotoxicitate şi citoliză prin două mecanisme diferite :

1) *Citoliza neimunologică*, consecutivă fagocitozei de către granulocitele neutrofile este o funcţie complementară celei a macrofagelor. În timp ce macrofagele distrug microorganismele parazite obligat intracelulare şi, în general, Gram-negative, granulocitele acţionează în special asupra bacterilor piogene şi Gram-pozitive, care sînt distruse sub influenţa mecanismelor complexe bactericide (vezi cap. *Sistemul fagocitar*). Enzimele şi sistemele microbicide eliberate din granulocite pot degrada şi unele celule tisulare, favorizînd îndepărtarea lor din organism.

2) *Citoliza imunologică*, prezentă în toate formele de inflamaţii imune, caracterizează intervenţia eozinofilelor în anumite reacţii de hipersensibilitate de tip imediat şi a bazofilelor în reacţii de tip întîrziat. Atracţia lor în focarele inflamatorii se poate realiza prin modalităţi multiple, ca, de exemplu, prin acţiunea limfokinelor eliberate de celulele T, a produşilor rezultaţi din lezarea ţesuturilor sau a componenţilor sistemului complement proveniţi din activarea căii clasice sau alternative.

Deoarece granulocitele au receptori F_c pentru imunoglobuline și receptori C3 pot ataca eficient microorganismele „acoperite" cu anticorpi. Dovada o constituie și sensibilitatea mărită față de infecțiile piogene recurente, a bolnavilor cu agamaglobulinemie sau cu deficit de C3.

În sfîrșit, granulocitele umane sînt capabile să exercite și o formă particulară de citotoxicitate mediată celular, dependentă de anticorpi, putînd ataca inclusiv celule-țintă tumorale (Martz, 1977).

Celulele NK

Existența unor fenomene de citotoxicitate exercitate de limfocite asupra celulelor tumorale este cunoscută mai de mult. Ea a fost demonstrată inițial în cazul limfocitelor provenite de la bolnavi purtători de tumori, care acționează față de propriile lor celule tumorale, ca și față de celule tumorale histologic și/sau etiologic identice provenite de la alți bolnavi. Mult timp s-a considerat că limfocitele indivizilor normali ar fi areactive și că lipsa lor de activitate antitumorală ar putea fi folosită pentru diferențierea de celule citotoxice. Takasugi și colab. (1973), precum și Oldham și colab. (1973) au demonstrat că anumite limfocite provenite de la indivizi normali pot liza celulele tumorale, printr-o activitate litică „spontană".

Conceptul de celule NK („Natural killer") a fost definit de Cantor și colab. (1979), pentru a caracteriza capacitatea celulelor limfocitare provenite de la indivizii normali de a omori *in vivo* celulele tumorale. În unele cazuri, activitatea „ucigașă normală" poate fi chiar mai mare decît cea a celulelor imunitare specifice (Herberman și Oldham, 1975). În prezent, celulele NK sînt definite ca o subpopulație relativ mică de limfocite prezente, în mod normal, la indivizii sănătoși, avînd activitate citotoxică spontană (fără o sensibilizare prealabilă) *in vivo* și *in vitro* față de o gamă largă de celule țintă (celule infectate cu virusuri, celule tumorale, celule hematopoetice normale etc.). Prezența lor, ca și activitatea la șoarecele atimic congenital („nud") și la animalele timectomizate la naștere demonstrează că reprezintă o categorie distinctă de celulele T propriu-zise.

Morfologie

Timonen și colab. (1979) au arătat că activitatea NK este asociată cu prezența unor limfocite mari, cu nucleu dantelat și granulații mari în citoplasmă. Herberman și colab. (1980) au confirmat aceste date, demonstrînd asocierea citotoxicității cu o categorie de celule, cunoscute sub denumirea de *limfocite mari granulare*, LGL („Large granular lymphocytes"), pe care le-au separat și purificat în gradient de densitate de Percoll. Fracțiunile obținute conțin în proporție de 75—85% celule LGL, caracterizate printr-un raport mare nucleu/citoplasmă, cîteva granulații caracteristice azurofile (eozinofile) în citoplasmă și capacitatea de a liza spontan celulele-țintă sensibile la NK. Fracțiunile celulare care conțineau limfocite mici și medii erau lipsite de activitate NK. Bolhuis și colab. (1986) au demonstrat că cel puțin 75% din limfocitele granulare mari din sîngele periferic uman sînt capabile de citoliză NK.

Celulele NK formează o mică parte din populația celulară din sînge sau splină. După Hood (1984), ele reprezintă ~5% din celulele mononucleare, după Bolhuis și colab. (1986) ~3—7% din celulele limfoide circulante, iar după Mowat (1987) ~15%. Sînt frecvente în splină și mai puțin în ganglionii limfatici. În țesuturile limfoide sînt prezente în special în centrii germinativi, putînd exercita un anumit rol în imunoreglare. Sînt neaderente pe vată de sticlă sau de nylon, și nefagocitare, deci nu aparțin sistemului fagocitar mononuclear. Ele recunosc celulele embrionare, celulele din măduva oaselor și timusul normal, precum și unele microorganisme. O serie de celule normale devin sensibile la liza NK după ce sînt infectate cu virusuri. Nu prezintă specificitate antigenică și nu sînt supuse restricției CMH. Celulele NK nu au memorie imunologică. Activitatea lor poate fi mărită sub acțiunea adjuvanților, a interferonilor sau a celulelor tumorale sau infectate cu virusuri.

Markerii și receptorii de suprafață

Celulele NK au pe suprafața membranei plasmatice, pe lîngă markerii specifici, o serie de markeri comuni cu diferite linii celulare ca: limfocitul T clasic, seria mielomonocitară și chiar granulocitară, fapt care face dificilă stabilirea originii și naturii lor.

Jondal și Pross (1975) au evidențiat prezența unui receptor pentru NK. Anticorpii monoclonali specifici acestui receptor recunosc ~99% din aceste celule. După Bolhuis și colab. (1986), acest receptor ar avea și o deosebită importanță funcțională. Celulele-țintă, normal rezistente la acțiunea NK, ar deveni sensibile dacă sînt acoperite cu IgG, care interacționează cu receptorii F_c de pe suprafața celulelor NK. În felul acesta, celulele NK ar deveni capabile să producă citotoxicitate mediată de anticorpi, suprapunîndu-se activității celulelor de tip K, definite prin această proprietate.

Celulele NK diferă de celulele T clasice prin lipsa complexului receptor de antigen T3 — Ti, datorită căreia nu manifestă capacitate de reacție cu specificitate tipică pentru antigene. Ele sînt $T3^-T11^+$. Aproximativ, 30—40% din celulele NK exprimă în concentrație mică antigene $T8^+$, iar 80—90% sînt $T11^+$. O parte din celulele NK circulante poartă markerul $T10^+$ prezent pe timocite, limfocitele B leucemice și T activate (nu însă și pe cele în repaus). De asemenea, se consideră că prezența markerului T-200 (Lyt-5^+), deși întîlnit și pe alte celule hematopoetice, ar fi utilă pentru identificarea NK: tratarea cu anticorp anti-Lyt-5 inhibă activitatea NK. După Mowat (1987), celulele NK umane pot fi identificate pe baza markerilor Leu-7 (HNK-1) și Leu-11. Celulele NK poartă un receptor slab pentru hematiile de oaie, care le permite să formeze rozete în condiții favorabile. La șoarece a fost identificat antigenul Thy-1, care, deși este prezent într-o formă slabă, asigură omorîrea celulelor în prezența anticorpilor monoclonali anti-Thy-1.

Celulele NK poartă receptori pentru factorul de creștere al celulelor T, care stimulează multiplicarea unora dintre ele, precum și o serie de markeri caracteristici (la șoarece NK • 1, Qa-4, Qa-5 etc.).

În sfîrșit, celulele NK au, probabil, receptori de natură glicoproteică ce recunosc structuri-țintă pe suprafața anumitor celule.

Fig. 176 prezintă o reprezentare schematică simplificată şi provizorie a receptorilor şi antigenelor de suprafaţă ai celulelor NK a căror identificare, localizare şi caracterizare biochimică este abia în curs de cercetare.

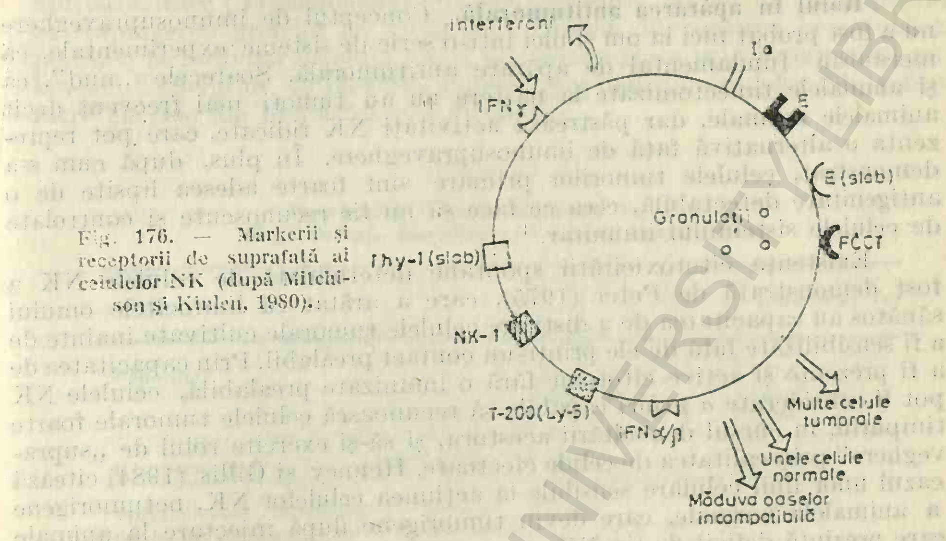


Fig. 176. — Markerii şi receptorii de suprafaţă ai celulelor NK (după Mitchison şi Kinlen, 1980).

Evidenţierea activităţii NK

Studiul rolului celulelor NK *in vivo* a fost mult uşurat de constatarea că şoarecele „beige" prezintă o deficienţă selectivă şi gravă a activităţii NK, datorită unei mutaţii punctiforme, care nu afectează funcţiile celulelor T şi ale macrofagelor (Roder şi Duwe, 1979). În coloniile acestor animale se înregistrează o frecvenţă mare a tumorilor (11 din 40 de şoareci au limfoame). Comportarea lor este foarte asemănătoare celei a bolnavilor cu sindromul Chediak-Higashi şi demonstrează bazele genetice ale activităţii NK. Datorită acestui deficit, tumorile normal sensibile la acţiunea celulelor NK prezintă o creştere accelerată după inoculare la şoarecele „beige", care este stopată prin transplantul de celule NK active. Riccardi şi colab. (1980) au studiat rolul celulelor NK *in vivo*, urmărind viteza de eliminare a celulelor tumorale premarcate cu ^{125}I-iod-dezoxiuridină la şoarece. Radioactivitatea scade după 2—4 ore (mai repede la animalele cu activitate NK intensă). Capacitatea de a elimina celulele tumorale, foarte intensă în splină şi în ficat, scade după 10—12 săptămîni, cînd scade şi activitatea NK.

În prezent, gradul de activitate citotoxică este apreciat *in vitro* prin capacitatea celulelor NK de a liza celulele marcate cu izotopul ^{51}Cr. Cantitatea de ^{51}Cr eliberat permite cuantificarea numărului de celule-ţintă omorîte. Se folosesc uzual celulele K 562, provenite de la un bolnav de leucemie mieloidă cronică în criză blastică, datorită sensibilităţii lor considerată ca standard.

Funcțiile celulelor NK

Datele experimentale pledează pentru cîteva funcții importante ale celulelor NK, deși potențialul lor de acțiune este încă incomplet cunoscut.

Rolul în apărarea antitumorală. Conceptul de imunosupraveghere nu a fost probat nici la om și nici într-o serie de sisteme experimentale, ca mecanism fundamental de apărare antitumorală. Șoarecele „nud", ca și animalele timectomizate la naștere nu au tumori mai frecvent decît animalele normale, dar păstrează activități NK ridicate, care pot reprezenta o alternativă față de imunosupraveghere. În plus, după cum s-a demonstrat, celulele tumorilor primare sînt foarte adesea lipsite de o antigenitate detectabilă, ceea ce face să nu fie recunoscute și controlate de celulele sistemului imunitar.

Existența citotoxicității spontane determinată de celulele NK a fost demonstrată de Peter (1975), care a arătat că limfocitele omului sănătos au capacitatea de a distruge celulele tumorale cultivate înainte de a fi sensibilizate față de ele printr-un contact prealabil. Prin capacitatea de a fi prezente și active citotoxic fără o imunizare prealabilă, celulele NK pot fi considerate *a priori* capabile să recunoască celulele tumorale foarte timpuriu, în cursul dezvoltării acestora, și să-și exercite rolul de „supraveghere" prin calitatea de celule efectoare. Henney și Gillis (1984) citează cazul unor linii celulare sensibile la acțiunea celulelor NK, netumorigene a animalele normale, care devin tumorigene după injectare la animale care prezintă deficit de tip NK.

Barlozzari și colab. (1985) consideră că activitatea celulelor NK este necesară, în special, pentru a controla apariția metastazelor hematogene. Ei au demonstrat că eliminarea selectivă a activității NK din organism determină o reducere a capacității de eliminare a celulelor de carcinom mamar injectate în circulație. Deficiența este compensată prin transferul unei populații de limfocite mari granulare (NK). Wiltrout și colab. (1985) au confirmat acest punct de vedere, demonstrînd că rezistența la metastazele induse experimental este corelată cu nivele ridicate local de activitate NK. În sfîrșit, Zoller (1985) a arătat că rezistența naturală a șobolanilor la fibrosarcom este limitată la primele stadii după transplantarea celulelor tumorale și la situsurile în care activitatea NK este cunoscută ca fiind în mod normal foarte ridicată. De altfel, o observație mai veche (Klein, 1977) arăta că 47% din bolnavii cu tumori dezvoltate erau lipsiți de activitate NK, prăbușirea acesteia putînd fi cel puțin în parte răspunzătoare de lipsa unei frîne în dezvoltarea tumorilor. El recomanda în aceste cazuri o terapie menită să inducă sau să stimuleze celulele NK.

Rolul în infecțiile virale. După cum s-a demonstrat, rezistența diferitelor tulpini de șoareci față de virusul citomegaliei murine este corelată cu activitatea celulelor NK și cu capacitatea de a secreta interferon. Celulele NK protejează evident celulele organismului-gazdă de infecția virală, dar importanța lor în comparație cu celulele T citotoxice nu este cunoscută. Ele ar acționa în fazele timpurii ale infecțiilor, înainte de apariția răspunsului imun, a celulelor T_C și T_D specifice și a anticorpilor.

Faptul că infecțiile virale apar uneori atît de frecvent, pledează pentru ideea că protecția conferită de celulele NK ar fi imperfectă.

Alte funcții ale celulelor NK. În ultimii ani s-a demonstrat capacitatea celulelor NK de a exercita activități antifungice (*Cryptococcus*), antiparazitare (*Trypanosoma*) etc. De asemenea, ele au un rol important în respingerea grefelor de măduvă a oaselor, în reglarea hematopoezei normale la indivizii omologi, ca și în imunoreglare prin intermediul citokinelor. Tabelul nr. 49 prezintă sintetic proprietățile celulelor NK comparativ cu cele ale limfocitelor T citotoxice.

Tabelul nr. 49

Proprietățile celulelor citotoxice NK și T_C
(după Bolhuis, Gravekamp și Van de Griend, 1986)

	Celula NK	Limfocitul Tc
Fenotipul	CD_2^+, $CD3^+$, $CD8^-$ sau $CD8^+$	$CD2^+$, $CD3^+$, $CD4^+$ sau $CD8^+$
Receptorii pentru Fc ai IgG(CD16)	Da	Nu
Specificitatea citotoxicității dependente de anticorpi, pentru celula tumorală-țintă	Largă	Limitată
Citotoxicitatea cu restricție CMHC	Nu	Da
Nivelul citotoxicității nespecifice	Ridicat	Scăzut
Proliferarea *in vitro*	Da	Da
Densitatea receptorilor IL-2 după activare	Moderată	Mare
Sensibilitatea activității litice față de:		
Interferoni	Mare	Mică
Interleukină-2	Mare	Mică
Fitohemaglutinină	Nu	Da
Anti-CD3	Nu	Da
Anti-CD2	Da: proliferare și citotoxicitate	Da: proliferare și citotoxicitate

Mecanismul lizei celulare

Celulele NK au capacitatea de a recunoaște și liza o gamă largă de celule tumorale *in vitro*. Evoluția procesului litic ar comporta patru faze distincte:

1) faza de recunoaștere a celulei-țintă și formarea de contacte cu celula efectoare;

2) faza de programare pentru liză, consecutivă legării;

3) declanșarea „loviturii" letale, prin formarea unui complex litic;

4) liza celulei-țintă, independentă de celula efectoare (Hiserodt și colab., 1982) (fig. 177 A).

Nu se cunosc încă natura receptorilor de care se leagă celulele NK și nici gradul de specificitate în recunoaștere. Pînă în prezent au fost incriminate următoarele molecule de pe suprafața celulelor-țintă: 1) unele glicoproteine, codificate de retrovirusuri situate pe suprafața celulelor tumorale (celulele NK lizează însă și celule tumorale de altă natură); 2) unele antigene fetale; 3) acidul sialic; 4) anumite glicozide membranare; 5) receptorul pentru transferină. În mod evident, celulele NK recunosc alte structuri decît cele de care se leagă celulele T_C și aceasta deosebește, în mod radical, liza celulară indusă de cele două tipuri de celule.

Mecanismul lizei este încă necunoscut. Au fost propuse două modalități:

1) După Podack (1985), celulele NK ar acționa printr-un proces de degranulare, cu eliberarea unor substanțe cu activitate citolitică rapidă și puternică. În sprijinul acestei ipoteze pledează cercetările efectuate asupra granulațiilor obținute și izolate în cantități mari din celulele NK (LGL) de la șoarecii bătrîni, bolnavi de leucemie Fischer asociată cu o activitate NK foarte intensă. De asemenea s-a demonstrat că anticorpii, față de granulațiile NK, inhibă nu numai liza mediată de granulații, ci și liza produsă de celulele NK umane sau de șobolan intacte. Microscopia electronică a demonstrat că sub acțiunea granulațiilor, în membrana plasmatică a celulelor-țintă apar structuri circulare („canale"), asemănătoare celor produse de sistemul complement, răspunzătoare de permeabilitatea celulară mărită și de liză.

2) Celulele NK purificate au capacitatea de a stimula producerea și secreția de factori solubili citotoxici („NK cytotoxic factors"), care produc o liză mai lentă (~ 18 ore), spre deosebire de celulele intacte și de granulații, care lizează în cîteva minute sau ore.

Influența vîrstei

Activitățile celulelor NK și K prezintă atît la șoarece, cît și la șobolan o evoluție caracteristică în raport cu vîrsta. Reactivitatea apare la vîrsta de 3—4 săptămîni, este maximă între 5 și 10 săptămîni, după care diminuă. Celulele NK apar „spontan" la indivizii tineri ai celor mai multe specii și, după cum s-a demonstrat, persistă perioade diferite de-a lungul vieții lor. Scăderea marcată a activității NK, asociată cu îmbătrînirea, ar putea explica creșterea incidenței tumorilor spontane la unele animale bătrîne.

Rolul interferonilor în activitatea celulelor NK

Datele experimentale demonstrează că interferonii (IFN) stimulează celulele NK umane și de șoarece, sugerînd participarea lor în activarea spontană a celulelor NK efectoare sau în menținerea activității lor. Saksela și colab. (1980) au arătat că limfocitele mari granulare în contact cu celulele-țintă produc ele însele IFN, în așa fel încît creșterea proporției

de celule NK active și a activității lor ar fi determinată de IFN produs endogen. Oppenheim, Ruscetti și Steeg (1984) au confirmat experimental acest fapt: îndepărtarea selectivă a celulelor care poartă antigenul de suprafață Lyt-5$^+$ din culturile de celule splenice de la șoarecele „nud" anulează activitatea NK, precum și producerea de IFN. Tratamentul celulelor respective cu IFN determină stimularea activității NK și exprimarea antigenului Lyt-5$^+$. Toate aceste date demonstrează că celulele NK Lyt-5$^+$ răspund la un stimul antigenic prin producerea de IFN, care activează celulele precursoare NK Lyt-5$^-$ la starea de celule NK efectoare Lyt-5$^+$.

Activitatea NK poate fi mărită și de inductori ai sintezei de IFN, cum sînt infecțiile virale și celulele tumorale. Interferonii măresc numărul celulelor NK legate de celulele-țintă și, de asemenea, măresc capacitatea litică a celor deja legate. Acțiunea lor este rapidă (2—12 ore), necesită sinteza de proteine, nu însă și proliferarea celulelor. Sînt active aproape toate speciile de IFN (α leucocitar, β fibroblastic și γ imun). După Hood (1984), IFN γ este cel mai activ, mărind cel mai intens activitatea citotoxică NK, iar după Bolhuis și colab. (1986), cei mai activi ar fi IFN α și β. După unii autori, ar exista două subpopulații de celule NK: una care produce IFN γ și α, după activare cu mitogeni, cu celule tumorale sau cu unele bacterii, și alta efectoare, care răspunde la IFN cu efecte citotoxice. Efectul stimulator al IFN la șoarece ar fi mai puternic pe celulele NK cu activitate ridicată, decît asupra celor cu activitate scăzută.

Mecanismul acțiunii IFN nu este cunoscut. Ei ar putea interveni pe mai multe căi:

1) direct asupra celulelor NK, fără nevoia de celule accesorii sau de structuri de recunoaștere;

2) determinînd inducția diferențierii precursorilor inactivi la celule NK efectoare;

3) inducînd producerea de receptori de IL-2 pe suprafața pre-NK și de receptori necesari pentru recunoașterea celulelor-țintă sensibile;

4) activînd celulele incapabile să se lege de celulele-țintă la forme active citolitice și/sau declanșînd mecanismele litice ale celulelor NK inactive deja legate de celulele-țintă;

5) mărind viteza de liză a unor celule deja active;

6) asigurînd reciclarea mai rapidă a celulelor NK litice, pentru a ataca alte celule-țintă.

În concluzie, interferonii joacă un rol esențial în interacțiunile celulare implicate în activitatea NK, fiind efectiv potențiatorii cei mai importanți ai acestora.

Rolul interleukinei-2. IL-2 mărește, de asemenea, activitatea NK, stimulînd creșterea celulelor NK *in vitro* și reactivitatea lor exteriorizată prin producerea de citokine, interferoni γ și α, IL-1, factori stimulatori ai coloniilor etc.

Mecanismul de acțiune este necunoscut. Blocarea efectului IL-2, cu ajutorul anticorpilor față de IFN γ, sugerează că IL-2 ar acționa prin intermediul stimulării producerii de IFN (fig. 177 B, 178).

Evidențierea activității citotoxice

În unele cazuri, cum este cel al hematiilor, acțiunea celulelor citotoxice este foarte evidentă, deoarece ea determină pierderea integrității membranei celulare și liza, asociată cu dispersarea hemoglobinei în mediu. În alte cazuri, cum este cel al celulelor din țesuturi, citotoxicitatea determină numai modificări limitate ale membranei, care permit însă înglobarea unor coloranți (eozină, albastru de tripan), față de care aceasta este în mod normal impermeabilă.

Una din tehnicile cele mai des folosite este *testul de eliberare a radiocromului*. El are la bază incubarea celulelor-țintă în medii cu $Na_2^{51}CrO_4$, care marchează structurile intracelulare. Incubarea celulelor marcate cu celulele citotoxice specifice este urmată de moartea celulelor-țintă și eliberarea markerului radioactiv în supernatant. Efectul citolizei specifice este apreciat pe baza raportului dintre $Na_2^{51}CrO_4$ total eliberat și cantitatea de ^{51}Cr eliberat spontan în supernatantul celulelor marcate, incubate în absența celulelor citotoxice. Testul este recomandabil pentru studiul unor forme bine definite de citoliză.

Testul de microtoxicitate Takasugi și Klein măsoară citostaza și citoliza prin aprecierea numărului de celule-țintă viabile la sfîrșitul perioadei de incubație (2—3 zile). Este preferabil pentru aprecierea citotoxicității reduse.

Originea și natura celulelor NK sînt necunoscute. Prezența lor în măduva oaselor, ganglionii limfatici, splină și sîngele periferic, ca și o serie de particularități morfofuncționale sugerează apartenența la grupul celulelor limfoide. După Bolhuis și colab. (1986) ar fi celule T imature, corespunzînd unui stadiu timpuriu de diferențiere, care nu pot evolua în condiții fiziopatologice spre celulele mature $T3^{+}T11^{+}$. Ar fi deci celule T cu capacitate de diferențiere limitată. Heterogenitatea lor fenotipică și funcțională ar putea reflecta faze diferite de diferențiere și/sau activare. Lehmann-Matthes (1979) însă, le consideră precursori ai macrofagelor funcționale.

*

Recent, Reynolds și Ortaldo (1987) au evidențiat faptul că termenii „celule NK" și „activitate NK" sînt atribuiți, pe baza activității lor funcționale, mai multor celule, cu fenotipuri foarte diferite sau chiar unor linii diferite de celule normale. Or, reunirea tuturor celulelor care posedă această activitate sub denumirea de celule NK este, după ei, la fel de incorectă ca și utilizarea termenului de macrofag pentru toate celulele cu activitate fagocitară. Pentru evitarea confuziilor generate de lipsa unui cadru conceptual exact, propun următoarele soluții :

1) Termenul NK să fie folosit exclusiv pentru a defini funcția de citotoxicitate nesupusă restricției CMH și nu pentru un tip particular de celule.

A
Celulă NK
Celulă tumorală „țintă"
Granulații
Citolizină
Receptor pentru citolizină
Legarea celulei „țintă"; situs de interacțiune fără recunoaștere antigenică
Programare pentru liză
Eliberare de citolizină
Complex litic
Liză

B
Celule tisulare
Celule infectate cu virus
Celule tumorale
Liză intensificată de:
Celulă Fc⁺ DR⁺
Virusuri
Macrofag
Producere de
Celule T Th⁺
T3
Antigen
Celulă NK activată
Celulă NK, T11⁺, Fc⁺, M1⁺
Activare
Interferon
IL-2
Producere de

Fig. 177. — Mecanismul lizei mediate de celulele NK. A. Situsul de interacțiune al celulelor NK cu structurile celulelor-țintă este necunoscut. Celulele-țintă se vor liza chiar dacă s-au detașat de celulele efectoare. B. Inducția sintezei de interleukină-2 și de interferoni și mărirea activității litice a celulelor NK sub acțiunea IL-2 (după Bolhuis, Graverkamp și Van de Griend, 1986).

Interleukina-2
Celulă NK citolitică
Supresie
Celulă Ts
Helper
Celulă precursor-NK
Celulă TH
Producere
Inhibiție prin feed back
Inducție RIL-2
Producere
Stimulare
Interferon

Fig. 178. — Rolul interferonilor și al interleukinei-2 în citotoxicitatea mediată de celulele NK.

2) Populația predominantă de celule care posedă această funcție să fie denumită *limfocite N* (*non-T/non-B*). Celulele N umane sînt limfocite granulare mari (LGL, $CD3^-$, $DC16^+$, $Leu\text{-}19^+$) și se deosebesc de celulele T_C pe baza apartenenței la o linie celulară diferită și a mecanismului de recunoaștere a antigenului.

Denumirea propusă are următoarele avantaje : 1) lasă deschisă posibilitatea descoperirii altor celule care posedă acest tip de activitate, oferind cadrul conceptual pentru clasificarea lor ; 2) nu perpetuează noțiunea incorectă conform căreia cea mai importantă (sau unică) funcție a celulelor NK este proprietatea de a liza celulele tumorale.

Analiza datelor din literatura de specialitate scoate în evidență următoarele funcții ale celulelor N :

1) Controlul creșterii celulelor tumorale prin : a) inhibarea dezvoltării tumorilor primare și b) controlul dezvoltării metastazelor.

2) Controlul unor infecții virale (gripă, herpes simplex etc.), bacteriene, fungice, parazitare intra- și extracelulare.

3) Proprietăți imunoreglatoare : a) reglarea anticorpogenezei ; b) reglarea imunității mediate celular ; c) reglarea activității celulelor T_S naturale.

4) Producerea de citokine.

5) Controlul creșterii și diferențierii celulelor-stem hematopoetice.

6) Respingerea alogrefelor (transplant de măduvă și organe).

7) Implicarea în anumite stări patologice : a) reacții grefă contra gazdă ; b) participarea în patogenia unor forme de anemie aplazică/neutropenie ; c) potențarea unor boli autoimune și neurologice ; d) dezvoltarea unor forme de diabet și boli gastrointestinale.

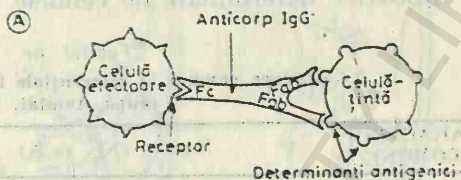
Revizuirea nomenclaturii nu este fără precedent. De cele mai multe ori, clasificările celulelor sau ale mesagerilor moleculari efectuate pe baza activității lor funcționale, detectate inițial, au fost totdeauna urmate de modificări (uneori repetate) ale nomenclaturii.

Celulele K

Celulele K („Killer cells", „ucigașe") sînt răspunzătoare de unele fenomene de citotoxicitate mediată celular dependentă de anticorpi, deci cu specificitate imunologică. Ele sînt prezente în sîngele periferic și în organele limfoide la indivizi normali, neimuni. Sînt neaderente și nefagocitare. Nu au Ig de suprafață și nici antigen Thy-1 la șoarece. Nu au capacitatea de a produce rozetarea hematiilor la om. Aparțin, probabil, liniei celulare monocit→macrofag. Spre deosebire de celulele NK și NC, care acționează independent de prezența anticorpilor, celulele K acționează numai asupra celulelor-țintă „acoperite" de anticorpi „imuni" sau „naturali", producînd liza lor, în absența sistemului complement.

Fenomenul a fost descris inițial de Möller (1965), care a evidențiat liza *in vitro* a celulelor de fibrosarcom indus cu metilcolantren. Ulterior

s-a demonstrat că are un caracter general și după descoperirea mecanismului lizei a primit denumirea de *citotoxicitate mediată celular dependentă de anticorpi* sau ADCC („Antibody dependent cell mediated cytotoxicity"). Efectul celulelor K este specific și selectiv : celulele martor, aflate în amestec cu celule-țintă identice „acoperite" cu anticorpi și cu celule K efectoare, nu sînt distruse.



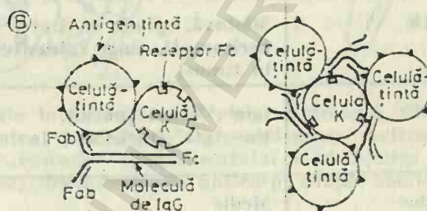


Fig. 179. — Citotoxicitatea mediată de celulele K. A. Reprezentare schematică a rolului de „punte" exercitat de anticorpi (după Henney, 1984). B. Rolul IgG anticorp în liza mediată de celule K (după Henney și Gillis, 1984).

Mecanismul lizei este incomplet cunoscut. Celulele K au pe suprafață receptori Fc pentru una din subclasele de IgG. Liza s-ar realiza prin legarea IgG de celule-țintă, urmată de legarea IgG prin segmentul Fc de celula K efectoare (fig. 179).

Liza s-ar produce printr-un mecanism asemănător celui descris în cazul celulelor T_C (excepție făcînd faza inițială, de recunoaștere, care este diferită). Rolul celulei-țintă este pasiv. „Lovitura mortală" („lethal hit") ar fi, și in acest caz, îndreptată asupra stratului dublu lipidic al membranei plasmatice. Cantitatea de anticorpi necesari pentru efectul citotoxic (liză) este mai mică decît cea utilizată pentru fixarea complementului în prezența celulelor de același tip. Dintre celulele care poartă receptori Fc, numai limfocitele B nu produc acest tip de citotoxicitate.

Hood și colab. (1984) consideră că, în anumite condiții, celulele NK se pot suprapune celulelor K, producînd citotoxicitate dependentă de anticorpi.

Rolul celulelor K nu este perfect definit. În condiții experimentale, *in vitro*, ele au un efect puternic față de celulele tumorale, de unii agenți patogeni, ca și față de diferite celule străine.

Rolul lor *in vivo* este încă misterios. Sensibilitatea foarte mare la blocare sub acțiunea complexelor imune face, teoretic, imposibilă funcționarea lor în organism.

După Hood (1984), raportul dintre celulele NK și K este necunoscut. Întrucît au mai multe caracteristici comune, ele ar putea face parte din

aceeași subpopulație de limfocite. Nu este exclusă posibilitatea existenței unui singur tip de celule efectoare, care ar interacționa fie direct citotoxic (ca o celulă NK) cu anumite celule-„țintă", recunoscute cu ajutorul unor receptori speciali (receptorii NK încă necaracterizați), fie ca o celulă K prin intermediul receptorilor Fc pentru IgG, în cazul celulelor-țintă acoperite cu anticorpi. Tabelul nr. 50 prezintă asemănările și caracterele diferențiale ale celulelor NK și K. Fig. 180 prezintă comparativ mecanismele citotoxice determinate de celulele T, macrofage și celulele K.

Tabelul nr. 50

Caractere comune și diferențiale între celulele NK și K (după Astaldi, 1980)

CARACTERE COMUNE	Șoarece (NK și K)		Om (NK și K)	
Frecvență/vîrstă	Absente la naștere; maximum între săptămîna a 5-a și a 9-a, apoi diminuare		Frecvență relativ constantă	
Distribuție	Măduvă, splină, cavitatea peritoneală, singe (absente în timus)		Splină, singe, mai puțin în amigdale și ganglioni limfatici (absente în timus)	
Markeri	Igm$^-$, Thy-1$^+$(puțin), Fc—IgG$^+$ (rar), CR$^-$, Ia$^-$		Igm$^-$, HuBLA$^-$, HuTLA$^+$, E$^{-/+}$; Fc—IgG$^+$ (rar$^-$). CR$^-$(rar$^+$)	
Dimensiune	Medie		Mică	
Adezivitate	Absentă		Absentă	
Sensibilitate la la radiații X	Rezistență moderată		Sensibilitate mare după 1 000 r	
DIFERENȚE	NK	K	NK	K
Citotoxicitate spontană	+	—	+	—
Citotoxicitate dependentă de anticorpi	—	+	—	+
Markeri	NK-1, HPA$^+$, Qa2$^{-/+}$, Qa4$^+$, Qa'5$^+$, Lyt-1$^{-/+}$ Lyt-5$^+$, Lyt-6$^+$	?	—	—
Efectele:				
— tripsinei	Inhibare reversibilă	Nule	Inhibare ireversibilă	Nule
— corticosteroizilor	Inhibare	Nule	Inhibare	Nule
— agregatelor de Ig	Nule	Inhibare	Inhibare	Inhibare
— complexelor imune celulare	Nule	Inhibare	Inhibare	Inhibare
— complexelor imune solubile	?	?	Nule	Inhibare

Henney și Gillis (1984) scot în evidență caracterul complex al implicării Ig-anticorp în acest tip de liză. Legînd în același timp antigenul-țintă și receptorul Fc al celulei efectoare, anticorpul servește ca „punte" de legătură între cele două celule (fig. vezi 179 A).

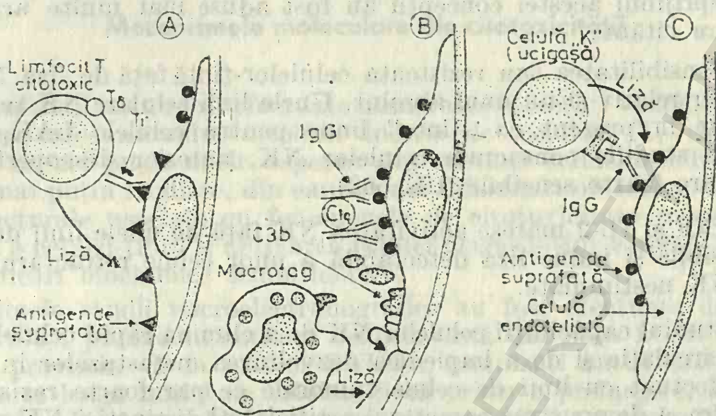


Fig. 180. — Mecanisme celulare implicate în distrugerea celulelor străine. A. Citotoxicitatea mediată de celulele T_C. B. Citotoxicitatea dependentă de complement. Activarea C1q de către IgG sau IgM determină activarea „cascadei" complementului cu producerea complexului litic. C. Citotoxicitate mediată celular, dependentă de anticorpi (după Souilou, 1985).

Ceva mai mult, după cum s-a demonstrat experimental, *in vitro*, nici legarea Ig și nici interacțiunile celulare izolate nu sînt suficiente pentru a produce liza. Ea necesită atît legarea receptorului Fc al celulei K de Ig, cît și interacțiunea directă concomitentă celulă — celulă. Este probabil că redistribuirea receptorilor Fc pe suprafața celulelor K la situsurile de contact intercelular ar mări activitatea de legare a celulelor efectoare de celula-țintă.

Citotoxicitatea naturală indusă de limfokine

Grimm și Rosenberg (1982) au descris o varietate de citotoxicitate naturală mediată de limfocitele izolate din sînge sau splină de la donatori sănătoși sau purtători de tumori maligne. Cultivate cîteva zile în prezența IL-2, acestea devin capabile să omoare *in vitro* numeroase tipuri de celule tumorale autologe sau alogenice, recent izolate sau provenind din anumite linii celulare, fără să afecteze celulele normale.

Fenomenul a fost descris și la șoarece și denumit *citotoxicitate naturală indusă de limfokine*. Deoarece determină și liza celulelor-țintă rezistente la activitatea NK, a fost considerat ca fiind determinat de o categorie aparte de celule efectoare, denumite *celule killer activate de limfokine* — LAK („*L*ymphokine *a*ctivated *k*illers cells").

Recent, Herberman și colab. (1987), interpretînd critic rezultatele obținute în 8 laboratoare internaționale, au ajuns la concluzia că cea mai mare parte din activitatea LAK, manifestată de limfocitele sanguine

sau splenice, este determinată de celulele NK activate de IL-2. Acest tip de activitate a fost demonstrat, de asemenea, ca derivat de la celulele T şi de la unele timocite (Hiserodt şi colab., 1987), dar rolul acestora pare să fie comparativ minor.

În sprijinul acestei concepţii au fost aduse mai multe argumente dintre care cităm:

1) Sensibilitatea sau rezistenţa celulelor-ţintă faţă de liza NK este un caracter relativ şi nu unul absolut. Unele linii celulare NK rezistente, considerate în prezent ca „ţinte" bune pentru celulele LAK, au fost folosite în studiile consacrate celulelor NK, anterior descoperirii unor linii celulare foarte sensibile (CK 562).

2) INF şi IL-2 măresc activitatea NK faţă de unele linii de celule-ţintă sensibile şi induc liza detectabilă a unor celule refractare faţă de celulele NK nestimulate.

3) Studiul capacităţii celulelor NK de a elimina rapid celulele tumorale din circulaţie şi de a împiedica dezvoltarea metastazelor în diferite organe, efectuat cu linii de celule tumorale ce par foarte rezistente la NK *in vitro*, a demonstrat caracterul artificial al distincţiei NK rezistent şi NK sensibil.

4) Progenitorii celulelor LAK şi celulele LAK efectoare au un fenotip foarte asemănător celulelor NK şi diferit de cel la limfocitelor tipice. Această particularitate a fost confirmată pentru celulele LAK umane, de la şoarece şi de la şobolan.

Pe baza acestor date, Herberman şi colab. (1987) consideră că activitatea LAK reprezintă mai degrabă un fenomen particular şi nu mărturia intervenţiei unui tip nou sau distinct de celule efectoare. El este important deoarece demonstrează capacitatea IL-2 de a stimula activitatea citotoxică şi expansiunea unei populaţii de celule NK efectoare. Această proprietate poate avea în viitor importante aplicaţii terapeutice, prin extinderea rolului lor în rezistenţa organismelor faţă de tumori. Experimentele pe animale au demonstrat rolul celulelor NK în prevenirea producerii metastazelor, dar nu au evidenţiat un efect similar asupra tumorilor stabilite în diferite organe. Unele date preclinice şi clinice recente, referitoare la fenomenul LAK *in vivo*, nu sugerează existenţa unei asemenea disocieri funcţionale. De aceea, este posibil ca administrarea unui număr suficient de mare de celule NK, intens activate cu IL-2, să aibă efecte puternice atît profilactice antitumorale, cît şi terapeutice.

Semnificaţia biologică generală a celulelor citotoxice

Celulele citotoxice, ca parte componentă a sistemului imunitar, ar participa la acţiunea de „supraveghere" imunologică, lizînd celulele nonself şi contribuind, uneori, în special la îndepărtarea precoce a primelor celule maligne abia apărute în organism. Deşi argumentul este din punct de vedere teleologic foarte important, probele în acest sens sînt foarte puţine, din cauza dificultăţii de a obţine date experimentale lipsite de ambiguitate.

În general însă, se consideră că celulele citotoxice sînt componente importante ale sistemului imunitar al mamiferelor, dar condițiile în care fiecare categorie își exercită efectul sînt încă nedefinite (Henney și Gillis, 1984).

Mecanismele moleculare ale citotoxicității

În ultimii ani au fost efectuate numeroase cercetări vizînd, în special, înțelegerea mecanismului citolizei induse de celulele T_C (T_{CL}). Este probabil că cel puțin unele aspecte sînt comune celulelor NK și K, în general mai puțin studiate, din cauza unor dificultăți obiective. Modificări ultrastructurale asociate cu fenomenele de citotoxicitate (recunoașterea specifică a celulei-țintă și activarea celulei ucigașe) sînt corelate cu o serie de modificări biochimice semnificative.

Primele studii microelectronografice au fost efectuate de Abel și colab. (1970), punînd în contact celulele-țintă din linia LC3H cu celule limfoide provenite de la șoareci BALB/c, imunizați anti-LC3H. Celulele efectoare se leagă inițial de celulele-țintă printr-o prelungire, după care se observă o lărgire rapidă a regiunii de contact intercelular și apariția unor interdigitații profunde, care măresc suprafața de legare și implicit eficiența citolizei. Datele referitoare la natura leziunilor membranare sînt contradictorii. Sellin și colab. (1971) sugerează, pe baza transferului bidirecțional al fluoresceinei, existența unei comunicări intercelulare, în timp ce Koren și colab. (1973) consideră că membrana celulei-țintă s-ar rupe, în timp ce cea a celulei efectoare rămîne intactă. În sfîrșit, Mandel și colab. (1974) confirmă prezența prelungirilor membranare interdigitate la nivelul zonei de contact dintre cele două tipuri de celule, nu însă și rupturile membranare. După ei, liza s-ar datora unor leziuni extrem de fine ale membranei celulelor-țintă.

Cercetări mai recente demonstrează că imediat după legarea celulei-țintă are loc o reorientare a structurilor intracelulare ale celulei citotoxice, caracterizată prin acumularea aparatului Golgi și a diferitelor organite în regiunea dintre nucleu și zona de contact cu celula-țintă. Centrul organizator al microtubulilor („Microtubule organizing center") și proteinele citoscheletale asociate (tubulina și actina) capătă o dispoziție polarizată, orientîndu-se în direcția celulei-țintă. Aceste rearanjări sînt corelate cu activarea specifică, deoarece nu au loc după legarea celulelor T_C de celule nespecifice sau rezistente la liză.

Modificările ultrastructurale sînt asociate cu creșterea concentrației de Ca^{2+} în citoplasma celulei ucigașe (evidentă după cîteva minute sau chiar după cîteva secunde) și de un flux de Ca^{2+} spre celula-țintă.

Modificări semnificative apar și în poziția granulațiilor, care se orientează spre zona de contact și uneori fuzionează cu membrana celulară. Mai multe observații experimentale sugerează rolul granulațiilor din celulele T_C și al echivalentelor lor din celulele NK (LGL). După izolarea lor de către Grossi și colab. (1983), s-a demonstrat că ele conțin enzime lizosomale (β-glucuronidază, arilsulfatază, fosfatază acidă), precum și unele serinproteaze ca tripsina, elastaza etc.).

Rolul granulațiilor și al constituenților lor este sugerat de următoarele argumente :

1) legarea celulelor efectoare de celulele-țintă este urmată de eliberarea și acumularea enzimelor la joncțiunea lor ;

2) substanțele care inhibă activitatea serinproteazelor inhibă și citoliza mediată de celulele T_C ;

3) leziunile induse de celulele T_C seamănă cu cele produse de sistemul complement, care conține, de asemenea, serinproteaze ;

4) pretratarea celulelor efectoare cu stronțiu, care stimulează degranularea, reduce activitatea litică a celulelor T_C.

Modificările și moartea celulei-țintă

Leziunile celulei-țintă sînt în principal reprezentate de modificări ale membranei nucleare și ale conținutului nuclear, asociate cu degradarea cromosomilor în fragmente mici (multipli de 200 pb), datorită acțiunii endonucleazelor activate de Ca^{2+}.

Moartea celulelor-țintă eucariote se poate produce, după Male, Champion și Cooke (1987), pe două căi :

1) Moartea prin necroză este caracteristică atacului imunologic mediat de sistemul complement. Ea are la bază creșterea permeabilității membranei celulare, urmată de pătrunderea apei, pentru a compensa creșterea presiunii osmotice determinată de macromoleculele citoplasmatice, „Umflarea" celulei, inițial reversibilă, este urmată de un proces ireversibil, asociat cu flocularea cromatinei nucleare, dezintegrarea membranei plasmatice și distrugerea integrității celulei.

2) Apoptoza (gr. „apo" — separare ; „ptosis" — cădere) reprezintă probabil, mecanismul tipic pentru citotoxicitatea indusă de celulele T_C. Ea are ca prim efect contracția celulei-țintă, dilatarea reticulului endoplasmatic și formarea de vezicule, care adesea fuzionează cu membrana celulară. Se adaugă modificările nucleului reprezentate de formarea de agregate dense de cromatină, invaginarea membranei nucleare etc. și condensarea celulei. Plierea membranei plasmatice duce la separarea celulei în mici fragmente celulare delimitate de membrane, numite corpi apoptotici („Apoptotic bodies"). Examenul cinematografic a evidențiat, după contactul intercelular, existența unor mișcări citoplasmatice („Bulging movements") ce determină apariția unor deformații neregulate ale celulei („Zeiosis") înainte de pierderea conținutului citoplasmatic. Final apare necroza secundară a corpilor apoptotici.

După Male, Champion și Cooke (1987), termenul de liză, în sens strict, este inadecvat pentru a caracteriza moartea celulelor-țintă produsă de atacul celulelor citotoxice.

Mecanismele moleculare ale omorîrii celulelor-țintă

Au fost formulate mai multe ipoteze, care încearcă să coreleze modificările structurale cu cele biochimice legate în special de conținutul granulațiilor din celulele efectoare.

Ipoteza lui Podack (1985), una dintre cele mai cunoscute, acordă un rol preeminent constituenților chimici ai granulațiilor și, în primul rînd, serinproteazelor. Aceste enzime, inactive în stare pură, ar putea acționa pe două căi : 1) favorizînd polimerizarea perforinelor și 2) acționînd în celula-țintă după ce au pătruns în interiorul ei prin canalele produse de moleculele de poliperforine în membrana acestora.

Ipoteza se bazează pe proprietățile perforinelor și pe leziunile membranare induse de acestea după incubarea *in vitro* a celulelor T_C (sau a granulațiilor izolate) cu celulele-țintă în prezența Ca^{2+}.

Perforinele, sau proteinele formatoare de pori („Pore forming protein"), sînt prezente în formă monomeră (62—63 kdal) inactivă în granulațiile celulelor T_C (Podack și Konigsberg, 1984). Ele reprezintă unul din constituenții majori ai granulațiilor. Au determinanți antigenici comuni cu C9 și cu complexul C7C8 al sistemului complement. În stare purificată determină apariția unor leziuni membranare asemănătoare (dar nu identice) celor produse de sistemul complement.

Au fost descrise două tipuri de leziuni :

1) Leziunile mari apar sub forma unor complexe tubulare care perforează membrana celulei-țintă, formînd canale transmembranare. Au un diametru de 160 Å și o înălțime aproximativ egală și sînt alcătuite din 18—20 de molecule de perforină, care alcătuiesc poliperforina 1 (g.m. 2×10^6 dal). Un segment de 120 Å din înălțimea tubului este expus pe suprafața membranei, iar restul străbate membrana, pătrunzînd în citoplasmă (fig. 181).

2) Leziunile mici au, de asemenea, structură tubulară, cu un diametru de 50—70 Å și o lungime de 100—120 Å. Sînt determinate de poliperforina 2. Nu sînt esențiale pentru liză, deoarece unele celule nu produc poli-PF2 și sînt totuși eficient lizate.

Perforina este activă numai în prezența Ca^{2+}, care ar fi implicați în polimerizare, în legarea perforinelor de membrana celulară și în programarea pentru liză.

Ipoteza lui Russel (1983), susținută de Golstein și colab. (1988), se bazează pe cîteva observații fundamentale, care sînt în contradicție cu modelul lui Podack. Cele mai importante sînt următoarele :

1) Perforinele nu sînt singurele molecule ucigașe prezente în granulațiile celulelor T_C. Au fost descrise și alte molecule, încă insuficient caracterizate biochimic și funcțional (citolizinele evidențiate de Henkart și colab. (1984), moleculele citolitice izolate de Liu și colab. (1987) etc.).

2) Primele semne de lezare a celulei-țintă nu apar la nivelul membranei celulare, cum ar fi de așteptat, ci la nivelul nucleului și al membranei nucleare. Or, este greu de explicat lezarea timpurie a nucleului de un agent citolitic ce produce pori transmembranari.

3) Anticorpii specifici antiperforină blochează capacitatea litică a perforinelor pure, nu însă și liza indusă de celulele T_C întregi.

4) Perforinele și activitatea lor litică nu au fost evidențiate la toate celulele citolitice sensibilizate *in vivo* sau *in vitro*.

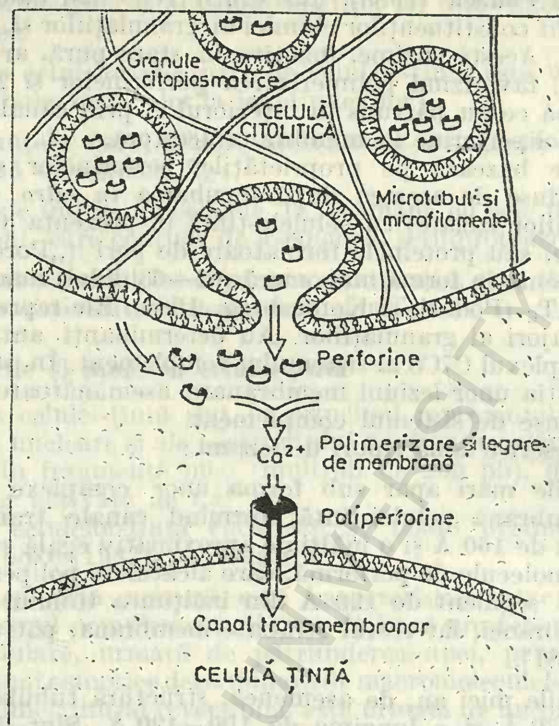


Fig. 181. — Reprezentare schematică a rolului exocitozei granulaţiilor şi al perforinelor provenite din limfocitele citotoxice în formarea canaliculelor transmembranare în celulele-ţintă (după Male, Champion şi Cooke, 1987).

5) Activitatea perforinelor este condiţionată de prezenţa Ca^{2+}, dar au fost descrise şi celule T_C efectoare fără Ca^{2+}.

Aceste argumente au determinat formularea unei ipoteze alternative, după care moartea celulei-ţintă nu ar fi determinată de o moleculă citolitică produsă de celula ucigaşă, ci de un fenomen de autoliză internă, declanşat printr-un mecanism necunoscut de către celula ucigaşă. Conform acestei ipoteze, numită a sinuciderii induse, modificările nucleului celulei-ţintă ar fi produse de o moleculă codificată de însăşi celula-ţintă.

Ipoteza lui Berke (1987) are la bază caracterul leziunilor produse de celulele T_C, care seamănă cu cele determinate de polilizine, de anumite toxine şi de cantităţile mici de detergenţi. După el, recunoaşterea celulei-ţintă determină perturbări funcţionale ale membranei sale, asociate cu apariţia unor zone de permeabilitate anormală la ioni, fenomene de polarizare ce duc final la liza celulei etc.

În sfîrşit, alte ipoteze implică participarea unor molecule diferite ca, de exemplu, factorul necrozant al tumorilor sau limfotoxinele. Activitatea limfotoxinelor ar fi consecutivă pătrunderii lor în celulele-ţintă pe calea „porilor" produşi de perforine, unde ar exercita efectul toxic. Acţiunea lor ar putea explica activitatea citotoxică a unor celule T_H.

Rezistența celulelor T_C efectoare la citoliză

Indiferent de natura moleculelor citotoxice și/sau citolitice, în mod normal, eliberarea lor în mediu în spațiul dintre celulele T_C și celulele-țintă ar trebui să lizeze ambele tipuri celulare. Or, după cum s-a demonstrat, fără echivoc, celulele T_C sînt capabile să reia ciclul de mai multe ori.

Pentru a explica această comportare paradoxală s-au dat mai multe explicații:

1) Procesul de omorîre ar fi unidirecțional deoarece activarea face celulele efectoare temporar rezistente la liză.

2) După Kupffer și colab. (1986), protecția celulei efectoare de acțiunea mediatorilor citotoxici secretați în spațiul intercelular ar fi asigurată de o proteină citoscheletală, numită talina (g.m. 250 kdal). Aceasta s-ar concentra pe fața internă a membranei plasmatice la nivelul regiunii de contact cu celula-țintă, asigurînd protecția de liză.

3) După Tschopp și Conzelman (1986), un rol protector esențial revine complexelor peptidoglican-condroitin sulfat A. Ele ar proteja, în primul rînd, celulele efectoare de autoliză, prin legarea moleculelor de perforină în granulațiile citoplasmatice ale acestora, care au un conținut cu pH scăzut ($\sim$pH 5,0). După exocitoza granulațiilor, în mediul intercelular cu pH ridicat, perforinele s-ar disocia de proteoglicani, ar fi polimerizate la poliperforine în prezența Ca^{2+} și ar induce liza celulei-țintă. Proteoglicanii difuzează mult mai lent, datorită greutății lor moleculare mai mari. Unele molecule rămîn legate de membrana granulațiilor fuzionate și leagă perforinele ce difuzează înapoi spre celula efectoare, protejînd-o de liză (fig. 182).

Procesul de citotoxicitate este deosebit de eficient. O celulă-țintă poate fi atacată simultan de mai multe celule T_C. O celulă ucigașă poate acționa succesiv asupra mai multor celule-țintă. Datele actuale nu exclud posibilitatea existenței mai multor tipuri de molecule citolitice și a mai multor mecanisme diferite, în funcție de natura celulelor ucigașe și/sau de natura celulelor-țintă. Totodată, ele nu exclud posibilitatea existenței mai multor mecanisme alternative în aceeași celulă efectoare „înarmată" pentru a face față oricărei celule-țintă.

Răspunsul imun, primar și secundar

Numeroase observații experimentale și epidemiologice au evidențiat importante deosebiri între cinetica și unele aspecte calitative și cantitative ale răspunsului imun primar și secundar. Ele sînt determinate de o serie de factori și, în primul rînd, de natura T-dependentă sau T-independentă a antigenelor.

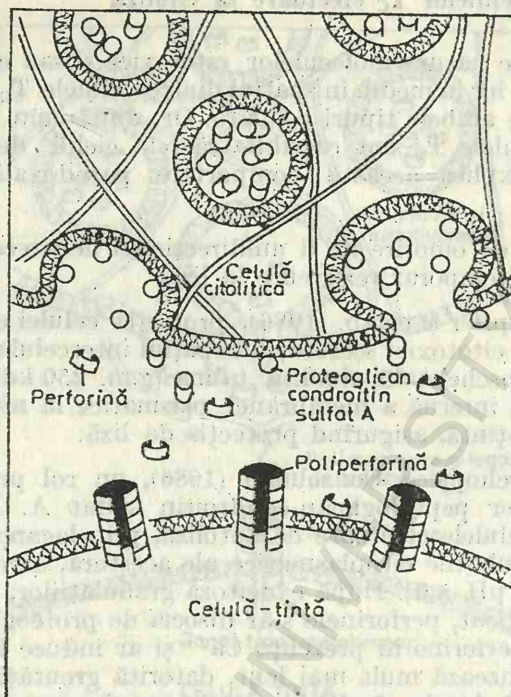


Fig. 182. — Rolul complexului proteoglican-condroitin sulfat A în protejarea celulelor efectoare de acțiunea mediatorilor citolitici (după Male, Champion și Cooke, 1987).

Răspunsul imun primar față de antigenele T-dependente

Este asociat în general cu producerea a două tipuri de Ig, IgM și IgG, și evoluează în 4 faze succesive:

Faza de latență are o durată variabilă, dependentă de natura și doza de antigen și de sensibilitatea tehnicilor de determinare. Parte din ea corespunde prezenței anticorpilor, în concentrații prea mici pentru a fi detectabile. După J. F. Bach (1976), această fază este de: 1) 20 de ore pentru fagul ΦX174, unul dintre cele mai bune imunogene. O doză de 0,01 μg produce anticorpi atît la un animal de laborator adult, cît și la un vertebrat cu sînge rece sau la un embrion de oaie gestantă; 2) 3—4 ore pentru hematiile de berbec; 3) 5—7 zile pentru proteinele solubile; 4) 10—14 zile pentru bacterii; 5) ~21 de zile pentru toxoidul difteric. Prima clasă de Ig care apare (ca și în filogenie) este IgM (fig. 183).

Faza de creștere a concentrației IgM este inițial exponențială. Timpul de dublare a titrului este de ~7 ore pentru fagul ΦX174 la cobai. Titrul maxim este atins în 4—5 zile pentru hematii, 9—10 zile pentru proteinele solubile, ~3 luni pentru anatoxine etc. IgG apare după o perioadă mai lungă, după ce titrul IgM este maxim sau în declin. Afirmația necesită un factor de corecție legat de faptul că în primele zile după imunizare, cînd cantitatea de IgG este mică, prezența ei este subapreciată datorită

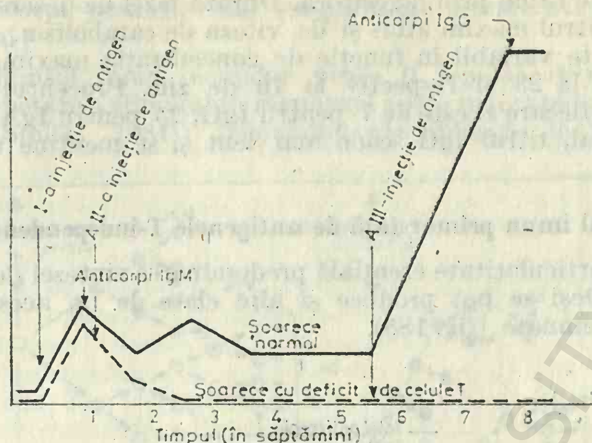


Fig. 183. — Reprezentare schematică a răspunsului imun la şoarecii normali sau cu deficit de limfocite T, după injectarea unui antigen peptidic sintetic. Producerea iniţială de IgM (răspunsul primar) este relativ independentă de celulele T. Răspunsul tardiv, caracterizat prin producerea de anticorpi IgG, este dependent de celulele T.

faptului că IgM polimeră pentavalentă este mai avidă şi biologic mai eficientă decît IgG (în hemaglutinare de ~ 750 de ori). Producerea de IgG ar începe după 2—3 zile, iar creşterea evidentă după 5—6 zile ar fi legată de scăderea sintezei de IgM şi „demascarea" prezenţei IgG. De altfel, la unele animale (iepure), tranziţia de la IgM la IgG este mai puţin netă.

Faza de platou cu durată variabilă corespunde menţinerii unei concentraţii ridicate, aproape constante.

Faza de descreştere este caracterizată de o scădere a titrului, iniţial lentă, apoi rapidă şi constantă (fig. 184). Scăderea rapidă este dată, pe de o parte, de faptul că sinteza Ig a încetat sau continuă la un nivel

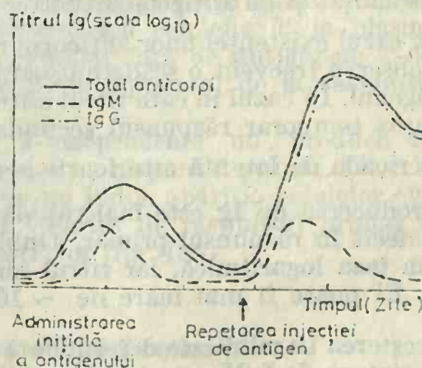


Fig. 184. — Dinamica apariţiei diferitelor clase de imunoglobuline în cursul răspunsului imun primar şi secundar la antigene timodependente.

nedetectabil şi, pe de alta, de prezenţa în circulaţie a unei cantităţi de anticorpi suficientă pentru a afecta concentraţia antigenului liber în ser prin neutralizare şi/sau formare de complexe antigen — anticorp, care

sînt îndepărtate rapid prin fagocitoză. Durata fazei de descreştere variază în funcţie de titrul maxim atins şi de viteza de catabolism. Astfel, T 1/2 pentru IgG este variabil în funcţie de concentraţia maximă, medie sau mică de la 11 la 23 şi respectiv la 70 de zile. Procentul anticorpilor catabolizaţi în fiecare zi este de 7 pentru IgG, 25 pentru IgA şi 18 pentru IgM. În general, titrul IgG scade mai lent şi se menţine un timp mai îndelungat.

Răspunsul imun primar faţă de antigenele T-independente

Are ca particularitate esenţială predominarea sintezei de IgM pentru toate fazele. Deşi se pot produce şi alte clase de Ig, acestea apar în cantităţi neînsemnate (fig. 185).

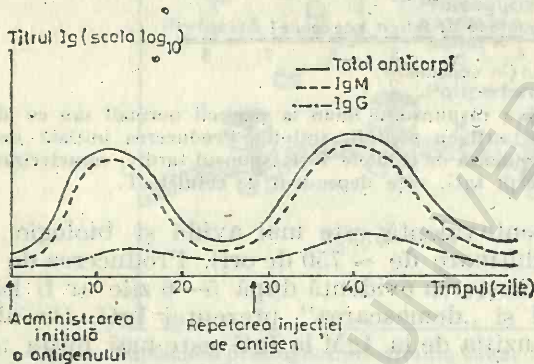


Fig. 185. — Dinamica apariţiei diferitelor clase de imunoglobuline în cursul răspunsului imun primar şi secundar la antigene timo-independente.

Răspunsul imun secundar faţă de antigenele T-dependente

Acest tip de răspuns este fundamental diferit:

1) poate fi iniţiat cu o doză mai mică de antigen;

2) natura antigenului este mai puţin importantă şi, ca urmare, poate fi declanşat şi de antigene înrudite;

3) în cazul existenţei unor anticorpi remanenţi din răspunsul primar iniţial se observă frecvent o scădere uşoară a titrului, datorită combinării lor cu antigenul. În cazul în care titrul anticorpilor persistenţi este ridicat, ei pot masca temporar răspunsul secundar;

4) perioada de latenţă este foarte scurtă;

5) producerea de Ig este mai rapidă şi atinge o concentraţie mult mai mare decît în răspunsul primar. Dublarea titrului are loc la fiecare 7—8 ore în faza logaritmică, iar titrul maxim este atins în < de două săptămîni. El poate fi mai mare de ~ 100 de ori;

6) creşterea titrului este determinată de producerea masivă de IgG, în timp ce sinteza de IgM este considerabil mai mică;

7) titrul Ig scade după o lună sau două, dar se menţine stabilizat, la nivel scăzut, o perioadă îndelungată de timp;

8) anticorpii produşi, chiar timpuriu, au o mare afinitate de legare a antigenului;

9) răspunsul imun secundar poate fi repetat de mai multe ori. Cu fiecare repetare a stimulului, răspunsul apare mai rapid şi cu intensitate mai mare (Smith, 1984); fenomenul are aplicaţie în hiperimunizări.

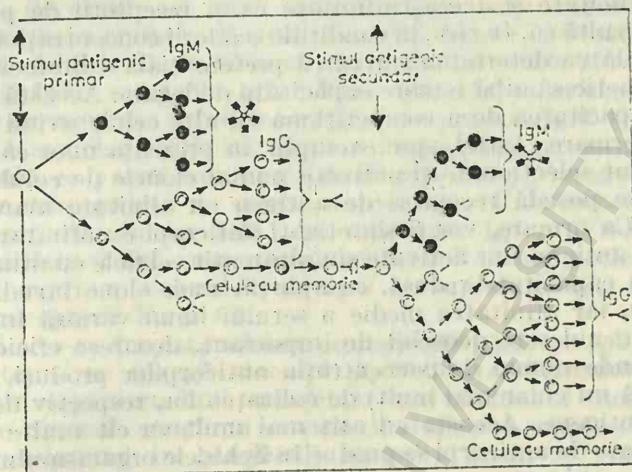


Fig. 186. — Reprezentare schematică a răspunsului imun. Stimulul antigenic primar induce diferenţierea celulelor imunocompetente la limfocite B, care sintetizează, în special, IgM (iniţial) şi IgG, precum şi la apariţia celulelor cu memorie. Răspunsul secundar (după cîteva săptămîni sau ani) este mai rapid şi mai intens, datorită celulelor cu memorie, precodificate pentru a răspunde la acelaşi antigen. Ele amorsează multiplicarea accelerată a celulelor care sintetizează şi secretă intens IgG (în special) şi IgM (după Relaval şi Rey, 1987).

În ansamblu, aceste particularităţi sînt determinate de trei factori: 1) numărul celulelor B imunocompetente care reacţionează cu antigenul respectiv este mărit după răspunsul primar; 2) creşterea bruscă a celulelor cu memorie (o singură celulă precursoare poate produce ~ 1 000 de celule cu memorie) (fig. 186); 3) diferenţierea celulelor B la plasmocite este mai rapidă. Răspunsul imun secundar faţă de antigenele T-dependente poate fi indus după minimum 2—4 săptămîni de la răspunsul primar.

Reinocularea antigenelor T-independente nu produce un răspuns de tip secundar, ci unul asemănător cu răspunsul primar. Clasa dominantă de Ig este IgM. Aceste antigene nu induc apariţia celulelor cu memorie. Cinetica producerii Ig nu este diferită de răspunsul primar şi nu este însoţită de o maturare a afinităţii lor (fig. 185).

Maturarea afinităţii anticorpilor

Anticorpii produşi în cursul răspunsului secundar faţă de un antigen T-dependent au, în general, o afinitate mai mare decît cei din răspunsul primar. Fenomenul este asociat cu tranziţia de la sinteza de IgM (care au

o afinitate medie de legare constantă 10^{-5} L/M, la IgG și este legat de un proces de „învățare" numit *maturarea afinității*. Experimental s-a demonstrat că, între altele, nivelul afinității depinde de doza de antigen introdusă în organism: dozele mari induc o maturare insuficientă și determină formarea de anticorpi cu afinitate mai slabă decît dozele mici.

Dacă admitem că anticorpii produși de o clonă de celule B au aceeași specificitate și aceeași afinitate ca și receptorii de pe suprafața lor (IgMm) rezultă că, *in vivo*, în condițiile scăderii concentrației de antigen, selecția clonală va determina activarea preferențială a limfocitelor predeterminate genetic să aibă o mare capacitate de legare. Această posibilitate le conferă capacitatea de a competiționa cu alte celule avînd proprietăți de legare inferioare. Astfel, spre exemplu, în prezența unor cantități mici de antigen sînt selecționate și activate numai clonele de celule B riguros specifice, care posedă receptori de antigen cu afinitate mare de legare (10^{-11} L/M). Ca urmare, vor fi sintetizați anticorpi cu afinitate mare. La doze mari de antigen sînt activate simultan atît celulele cu afinitate mare, cît și cele cu capacitate redusă, ce aparțin unor clone înrudite ($10^{-8} \rightarrow \rightarrow 10^{-11}$ L/M), iar afinitatea medie a serului imun variază între mică și medie. Fenomenul este deosebit de important, deoarece eficiența imunizării nu depinde numai de concentrația anticorpilor produși, ci tot atît de mult (dacă nu chiar mai mult) de calitatea lor, respectiv de afinitatea lor pentru antigene. Aceasta cu atît mai mult cu cît multe procese de apărare mediate de anticorpi se produc în lichidele organismului la concentrații mici de antigene.

Memoria imunologică

Particularitățile răspunsului imun secundar sau anamnestic (gr. „anamnesis" — a-și aminti din nou) reflectă capacitatea unui organism sau a unor celule imunocompetente de a răspunde modificat (mai rapid și în mod deosebit de intens) la o nouă stimulare cu antigenul întîlnit anterior. Memoria imunologică este deci expresia răspunsului modificat, determinat de un stimul imunogen, ca rezultat al unei întîlniri anterioare cu el. Ea implică specificitatea pentru un determinant antigenic și exclude reacția modificată, asociată cu modificările generale ale reactivității imune.

Inițial s-a considerat că memoria imunologică este apanajul celulelor T. Următoarele argumente demonstrează existența a două tipuri de celule cu memorie, T și B:

1) Tratarea limfocitelor de șoarece cu ser anti-Thy-1 (produs față de antigenul Thy-1, denumit anterior thêta, specific celulelor T) inactivează aproximativ toate celulele T și suprimă capacitatea acestora de a genera un răspuns secundar *in vivo* și *in vitro*.

2) Tratarea limfocitelor cu ser imun anti-B determină suprimarea capacității acestora de a induce un răspuns secundar în anticorpi. Adăugarea de celule B cu memorie restabilește această capacitate.

3) Producerea anticorpilor față de un complex haptenă — proteină depinde de cooperarea celulelor T specifice pentru purtător și cu celulele B specifice pentru haptenă. Primul contact cu proteina purtător (prin care

este indusă activarea celulelor T specifice pentru purtător) mărește sinteza anticorpilor specifici pentru haptenă, dacă organismul este ulterior stimulat cu conjugatul proteină—haptenă. Aceasta demonstrează existența celulelor T cu memorie (Moța, 1986).

Celulele cu memorie prezintă o mare heterogenitate sub raportul mărimii lor, al exprimării antigenelor codificate de CMH, iar în cazul celulelor B, de altfel cel mai mult studiate, sub raportul izotipului globulinelor de suprafață. Rezultatele sînt foarte contradictorii. După unii autori, celulele B cu memorie ar fi în proporție de 2/3 IgG^+, iar restul de 1/3 IgM^+ sau IgM^+/IgD^+. Unele cercetări au evidențiat existența unor celule cu memorie avînd receptori de suprafață IgM și IgD asociate cu IgG, IgA sau chiar IgE. Datele care evidențiază prezența în circulație a unor celule ce poartă combinații de diferite izotipuri sugerează existența mai multor subpopulații de celule cu memorie. Unii cercetători atribuie un rol important celulelor IgD^+, iar alții celor IgD^- (Vitetta, 1984). În sfîrșit, după Zola (1985), majoritatea celulelor B de memorie pierd capacitatea de a exprima moleculele de IgD pe suprafața lor, iar unele pot pierde și receptorii Fc și C3.

După ce s-au format, celulele cu memorie părăsesc splina, ganglionii limfatici etc. și se adaugă stocului de limfocite recirculante, care pot „patrula" în organism, luni sau chiar mai mulți ani („celule cu viață lungă") pe traseul ganglioni → vase limfatice → sînge → țesuturi sau, alternativ, reintrînd în ganglionii limfatici printr-o venulă adaptată acestui scop (fig. 187). Ele sînt activate mai rapid decît celulele virgine în prezența antigenului specific și sînt, de asemenea, capabile de diferențiere mai rapidă și de conversie la celule efectoare.

Modul de formare a celulelor cu memorie este necunoscut. După Cooper și colab. (1984), celulele cu memorie ar putea fi rezultatul unei diferențieri asimetrice a celulelor activate de antigen, în sensul că unele dintre ele se diferențiază pînă la stadiul de celule efectoare, în timp ce altele se reîntorc la stadiul de limfocit mic cu memorie.

După altă ipoteză, ele ar putea deriva din multiplicarea selectivă a celulelor reactive la antigen cu afinitate foarte mare de legare. Ipoteza se bazează pe unele date care sugerează că celulele cu memorie au receptori de antigen cu afinitate mai mare sau chiar cu natură chimică diferită de celulele reactive la antigen.

După Paul (1985), în cursul răspunsului imun, față de un antigen dat, nu toate celulele B activate sînt influențate de factorul de diferențiere celulară (BCDF) suficient pentru a-și completa ciclul pînă la stadiul de plasmocit. Celulele care nu ajung la acest punct terminus, ar deveni celule cu memorie.

În sfîrșit, după o altă ipoteză, unele celule B cu memorie ar fi descendente ale celulelor blast din centrii germinativi, în timp ce altele ar proveni dintr-un precursor comun și ar evolua de-a lungul unei linii paralele de dezvoltare cu celulele efectoare, fără să ajungă la stadiul de plasmocit.

Mecanismul memoriei imunologice. Deși manifestările memoriei imunologice sînt bine cunoscute, nu există o explicație univocă a meca-

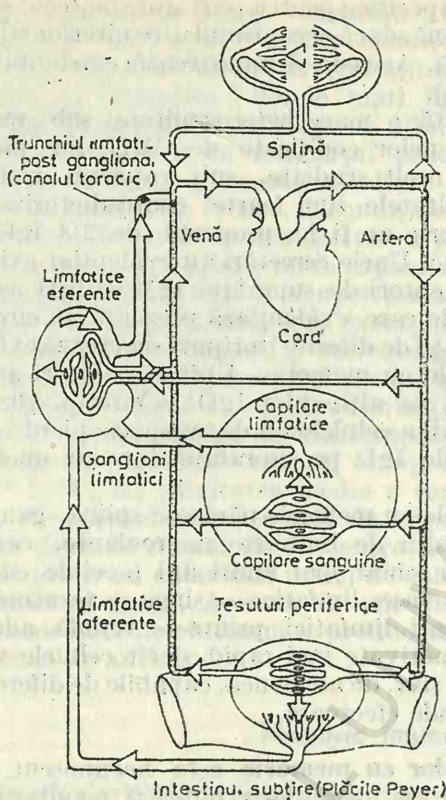


Fig. 187. — Reprezentare schematică a căilor majore de recirculare a limfocitelor, indicînd migrarea lor în organele limfoide secundare (ganglionii limfatici, splina și plăcile Peyer), ca și în cele mai multe țesuturi periferice. Limfocitele din plăcile Peyer ajung la ganglionii mezenterici, pe calea limfaticelor aferente și îi părăsesc prin limfaticele eferente, reintrînd în circulație pe calea trunchiului limfatic postganglionar (canalul toracic) (după Male, Brostoff și Cooke, 1987).

nismelor lor. Au fost incriminate mai multe cauze, menite să explice două dintre particularitățile majore ale memoriei imunologice și anume : răspunsul mai rapid și mai intens. Printre cele mai importante cauze sînt următoarele :

1) creșterea numărului de celule precursor sensibile la un anumit antigen, determinată de răspunsul primar, în așa fel încît numărul celulelor purtătoare de receptori specifici este mai mare înainte de aplicarea stimulului secundar ;

2) capacitatea mărită de autoreînnoire și de expansiune clonală, prin proliferarea celulelor cu memorie ;

3) perpetuarea unor clone cu viață lungă prin multiplicare lentă, eventual asociată cu un proces de stocare a antigenului ;

4) după doctrina „păcatului originar" („The doctrine of original sin"), formulată de Fazekas de St. Groth (1966), celulele care au întîlnit un anumit antigen păstrează „amintirea" contactului inițial și reacționează rapid și intens la reîntîlnirile ulterioare cu el ;

5) după Smith (1984), care consideră că memoria imunologică ar fi corelată mai degrabă cu ideea de reglare decît cu cea de „reamintire", un rol esențial în apariția ei ar avea limfokinele, care reglează proliferarea și diferențierea limfocitelor;

6) în sfîrșit, un mecanism încă insuficient explorat, dar posibil, al memoriei pe termen lung ar fi reprezentat de existența circuitelor idiotipice. În conformitate cu teoria rețelei formulată de Jerne (1974), ele ar putea avea o capacitate de stimulare endogenă continuă (Bona și Pernis, 1984).

Memoria imunologică are frecvent o durată mare, corelată cel mai adesea cu eficiența răspunsului primar și cu capacitatea limfocitelor de a răspunde la doze mici de antigen. La cobaii imunizați cu fagul ΦX174, persistă toată durata vieții. La om, memoria consecutivă imunizării cu anatoxine (difterică și tetanică) persistă, în unele cazuri, ~20 de ani (Gottlieb, 1964), iar după Abramoff și La Via (1970), chiar tot restul vieții. Fenomenul are o importanță deosebită în stabilirea schemelor de vaccinare.

Competiția antigenelor

Animalele injectate cu un amestec de mai multe antigene produc adesea anticorpi față de toți componenții amestecului. Uneori, cantitatea de anticorpi produși poate chiar să depășească pe cea produsă de antigenele injectate separat.

Competiția antigenică este rezultatul unei interferențe în răspunsul imun, corespunzînd situației în care imunogenitatea unui antigen influențează negativ efectul altuia, administrat simultan sau consecutiv (fig. 188). Ea se manifestă în grade diferite, prin întîrzierea răspunsului, di-

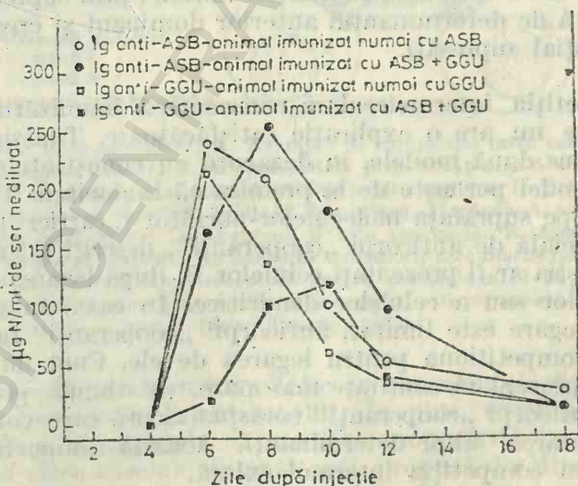


Fig. 188. — Cinetica producerii anticorpilor la puii de găină, injectați cu 20 mg/kg corp de albumină serică bovină (ASB), cu gamaglobulină umană (GGU) sau cu o combinație a lor. Titrul anticorpilor este exprimat ca μg de N/anticorpi per ml ser nediluat (după Abramoff și Wolfe, 1970).

minuarea titrului sau chiar prin supresie, în funcție de natura, cantitățile, absolute și relative, ale antigenelor inoculate, constituția genetică și starea fiziologică a animalelor etc. Au fost descrise trei tipuri de competiție :

1) **Competiția intramoleculară** corespunde situației în care antigenul poartă mai mulți determinanți, cu specificități diferite, situați pe aceeași moleculă imunogenă. În acest caz, în conformitate cu teoria selecției clonale, fiecare determinant va fi recunoscut de o subpopulație diferită de limfocite, care poartă receptori de suprafață, capabili să îl recunoască specific. Dacă unele subpopulații vor fi prezente în număr mai mare sau dacă vor avea o afinitate de legare mai mare pentru anumiți determinanți, aceștia vor fi legați preferențial. Ca urmare, producerea de anticorpi față de unii determinanți antigenici „dominanți" va predomina, în dauna producerii de anticorpi față de alții (determinanții „supresați") (fig. 189).

Dominanța anumitor determinanți în competiția intramoleculară este deci rezultatul unui număr mai mare de celule specifice sau al afinității lor mai mari pentru ei, comparativ cu numărul și/sau afinitatea celulelor care poartă receptori pentru alți determinanți, de pe aceeași moleculă (Taussig, 1973). Unele subpopulații de limfocite pot fi predominante, datorită unui contact anterior cu același antigen, care a produs memorie imunologică, sau cu unul înrudit, care determină reacții încrucișate. Dovada existenței acestui mecanism este furnizată de capacitatea anticorpilor produși, față de determinantul dominant, de a anula competiția intramoleculară, prin blocarea specifică a legării acestuia de receptorii celulelor B. În felul acesta, celulele B care poartă receptori pentru determinanții inițial supresați se pot combina cu aceștia (fig. 189). Ca urmare, are loc o inversare a situației inițiale, prin supresia producerii anticorpilor față de determinantul anterior dominant și creșterea sintezei față de cei inițial supresați.

2) **Competiția intermoleculară** consecutivă imunizării cu un amestec de antigene nu are o explicație satisfăcătoare. Taussig și Lachman (1973) au propus două modele, în dezacord cu cunoștințele actuale.

Primul model pornește de la premisa că limfocitele T recunosc determinanții de pe suprafața moleculelor-purtător („carrier") și eliberează o categorie specială de anticorpi „cooperanți", descriși și sub denumirea de „IgX". Aceștia ar fi prezentați celulelor B, după legarea lor de suprafața macrofagelor sau a celulelor dendritice. În cazul în care numărul situsurilor de legare este limitat, anticorpii „cooperanți" față de diferite antigene vor competiționa pentru legarea de ele. Cînd un determinant antigenic este prezent în cantitate mai mare, va stimula producerea unui excedent de anticorpi „cooperanți" corespunzători, care vor inhiba competitiv „prezentarea" altor determinanți. Această comportare ar explica efectul dozei în competiția intermoleculară.

Al doilea model, propus în ideea de a atenua dezacordul cu datele actuale, consideră că anticorpii „cooperanți" s-ar lega direct de celulele B, probabil prin intermediul receptorilor pentru regiunea Fc a Ig, creînd astfel posibilitatea captării și „focalizării" preferențiale a antigenelor pe

celulele B specifice. Cînd două antigene sînt administrate simultan, competiţia poate apărea cînd anticorpii „cooperanţi" pentru un antigen ocupă situsurile Fc de pe celulele B, care poartă receptorii specifici pentru celălalt antigen.

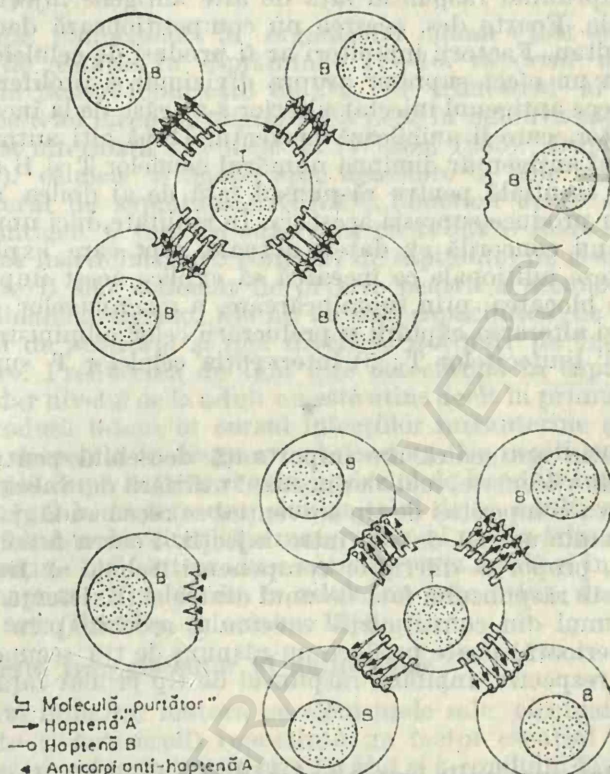


Fig. 189. — Competiţia intramoleculară. A. Exemplu de competiţie între celule B cu diferite specificităţi pentru antigen. Celulele B cu specificitate pentru haptena A sînt în număr mai mare sau au receptori cu afinitate mai mare decît cele pentru haptena B. Ele competiţionează cu mai mare succes pentru o cantitate limitată de antigen. Haptena A este determinantul dominant. Producerea anticorpilor anti-haptenă B este supresată. B. Abolirea competiţiei intramoleculare de anticorpii anti-determinantului dominant, care blochează legarea acestuia de receptorii celulei B. Celulele B cu receptori pentru determinantul B, iniţial supresat, se combină cu acesta: creşte formarea anticorpilor anti-B, este supresată cea a anticorpilor anti-A (după Taussig, 1973).

Ambele modele sînt în contradicţie cu cunoştinţele actuale privind prelucrarea şi „prezentarea" antigenelor. În plus, existenţa unor subpopulaţii de celule T, capabile să medieze cooperări intercelulare, prin intermediul unei clase speciale de anticorpi, propusă de Mitchison (1970), precum şi de Nossal şi Ada (1971), nu a fost confirmată şi este în profund dezacord cu cunoştinţele actuale privind funcţiile acestor celule. De asemenea, nu există nici o probă univocă privind existenţa anticorpilor „cooperanţi".

3) **Competiția intermoleculară secvențială.** Multe dintre efectele competitive observate după administrarea secvențială a unor antigene au fost explicate ca rezultat al producerii unor factori umorali, cu rol de inhibitori nespecifici ai răspunsului față de un al doilea antigen. Se consideră, în general, că primul antigen administrat s-ar comporta ca dominant, suprimînd răspunsul față de alte antigene injectate în următoarele 10 zile. Foarte des, acestea nu competiționează dacă sînt administrate simultan. Factorii inhibitori ar fi produși de celulele T stimulate și ar exercita un efect supresor asupra diviziunii și proliferării celulelor T și B, deoarece antigenul injectat ulterior s-ar găsi, de la început, într-un mediu inhibitor, care îi anihilează prezența. După alți autori, răspunsul față de primul antigen ar diminua numărul celulelor T și B a căror interacțiune este esențială pentru răspunsul față de al doilea antigen și în felul acesta ar produce supresia acestuia. În realitate, nici unul din modelele propuse nu concordă cu datele actuale, fapt care explică numărul mare de ipoteze adiționale ce încearcă să explice acest important fenomen prin : 1) blocarea, prin supraîncărcare, a macrofagelor de către primul antigen și alterarea captării și prelucrării celor administrate ulterior ; 2) „paralizia" limfocitelor T ; 3) intervenția celulelor T supresoare etc.

*

Competiția antigenică are importanță deosebită pentru stabilirea programelor de vaccinare, mai ales în cazul utilizării de vaccinuri asociate. Pentru evitarea competiției de tip secvențial se recomandă păstrarea unui interval de minimum 30 de zile între injecții. Pentru a asigura imunizarea optimă, proporția diferiților componenți trebuie să fie echilibrată, evitînd supresia răspunsului față de unul dintre ei. Existența unei imunități față de unul din constituenții vaccinului asociat (prin infecție sau vaccinare anterioară) poate produce un răspuns de tip secundar față de componentul respectiv, inhibînd răspunsul de tip primar față de ceilalți.

Interacțiunile imunologice dintre mamă și făt

Numeroase date experimentale scot în evidență complexitatea interacțiunilor imunologice dintre organismul matern și cel fetal. În primul rînd, ele demonstrează că deși embrionul are un caracter pe jumătate nonself pentru organismul matern (corespunzînd faptului că jumătate din materialul genetic provine de la tată) este perfect tolerat. Ceva mai mult, în momentul implantării oului fecundat, uterul apare în mod anormal de receptiv pentru grefe. Un rol important în protecția embrionului are trofoblastul *, care acționează ca o adevărată barieră imunologică, evitînd contactul direct dintre celulele materne, capabile să recunoască moleculele nonself și moleculele fetale, împiedicînd astfel imunizarea mamei față de făt (Beer și Billingham, 1973). În felul acesta, fătul este protejat

---

* Trofoblast — ansamblul celulelor periferice ale blastocistului (la mamifere, rezultatul concepției în stadiul de postmorulă), care leagă oul fertilizat de peretele uterin, asigurînd formarea placentei și a membranelor, care protejează și hrănesc organismul în curs de dezvoltare.

nu numai de lumea externă, ci şi de stimularea antigenică, exceptînd cazul unor proteine materne sau al infecţiei cu anumiţi agenţi patogeni (rubeolă, SIDA, sifilis, toxoplasmoză etc.), care pot trece prin placentă.

Imunologia fătului

Prezenţa limfocitelor în organismul uman a fost observată după 7 săptămîni de gestaţie. În săptămînile 11—16, raportul dintre celulele pre-B şi B, în ficatul fetal, este de 2/1. În trimestrul al doilea, precursorii limfocitelor încep să migreze din ficat în măduva oaselor, unde are loc maturarea ulterioară a celulelor B (Wilson, 1985). După Rosenthal şi colab. (1983), celulele B fetale, spre deosebire de cele adulte, exprimă masiv markerul de suprafaţă CALLA („*C*ommon *a*cute *l*ymphoblastic *l*eukaemia *a*ntigen"), ceea ce sugerează că la făt o mare proporţie din celulele B sînt foarte imature. După 24 de săptămîni de gestaţie, populaţiile de celule B sînt suficient de diverse pentru a recunoaşte, virtual, orice determinant antigenic. Ele nu au însă capacitatea de a produce un nivel normal de anticorpi şi nici diversele izotipuri de Ig, atît *in vivo*, cît şi *in vitro*. Producerea de IgM este detectabilă în săptămîna a 20-a de gestaţie, dar nivelul de la adult nu este atins decît în primul an de viaţă. IgM este produsă intens în cursul infecţiilor intrauterine şi are chiar o semnificaţie deosebită în diagnosticul acestora. La copiii normali, nivelul lor creşte rapid după naştere şi atinge nivelul de la adult între 3 şi 6 luni. Deşi nivelul IgG la naştere este similar celui de la adult, cea mai mare parte sînt dobîndite din circulaţia maternă, în al treilea trimestru de gestaţie. Foarte puţine IgG sînt produse activ în viaţa fetală şi în primele 3—6 luni după naştere. Nivelul de la adult nu este atins, de regulă, decît după 6—8 ani (Buckley şi colab., 1968).

Transferul transplacentar al anticorpilor

Sistemul imunitar matern cu elementele sale efectoare (celule imunocompetente şi anticorpii) reprezintă un factor esenţial pentru supravieţuirea speciei, asigurînd protecţia fătului şi a copilului faţă de infecţiile intrauterine şi din primele luni de viaţă. Importanţa transferului transplacentar al anticorpilor depinde de specia animală şi în mod deosebit de tipul de structură a placentei, respectiv de numărul structurilor, natura şi grosimea ţesuturilor materne şi fetale, interpuse între cele două circulaţii sanguine. În oarecare măsură, aceste caracteristici variază şi în funcţie de stadiul sarcinii.

În afară de placentă, la unele animale (iepure, şobolan, cobai) există şi posibilitatea transferului anticorpilor prin sacul vitelin, care la aceste specii are o mare suprafaţă potenţial absorbantă prin care pot prelua mari cantităţi de anticorpi, ce trec în lumenul uterin. La aceste specii nu se cunoaşte contribuţia relativă a placentei şi a sacului vitelin în transfer. La om şi maimuţe, sacul vitelin este rudimentar. Au fost descrise patru tipuri de placentă, care reflectă, după Gill (1975), gradul diferit în care acestea (alcătuite exclusiv din ţesuturi embrionare) pătrund în interiorul ţesuturilor uterine şi gradul corespunzător de distrugere al acestora:

1) *Placenta epiteliocorială*, prezentă la cabaline, bovine şi porcine, este caracterizată printr-o separare completă a ţesuturilor fetale şi materne.

Trofoblastul este „aplicat" pe epiteliul uterin. Între cele două țesuturi, un „lapte uterin" aduce substanțele nutritive și oxigenul. Transferul anticorpilor este complet împiedicat.

2) *Placenta de tip sindesmocorial*, prezentă la ovine, este caracterizată printr-o erodare a epiteliului mucoasei uterine și o „cufundare" a embrionului în țesutul conjunctiv matern. Ea nu permite transferul anticorpilor.

3) *Placenta endoteliocorială* are drept caracteristică o „erodare" a epiteliului și țesutului conjunctiv matern, datorită căreia trofoblastul este direct înconjurat de vasele sanguine materne. Prezentă la cîine și la pisică, asigură numai un transfer limitat al anticorpilor.

4) *Placenta hemocorială*, întîlnită la om, maimuțe, iepure și cobai, este caracterizată printr-o adevărată „scufundare" a trofoblastului direct în sîngele matern și prin dispariția sa în teritoriul străbătut de vasele sanguine (fig. 190). Acest tip de structură favorizează transferul anticorpilor, asigurînd, la naștere, o concentrație egală sau superioară celei întîlnită în organismul matern.

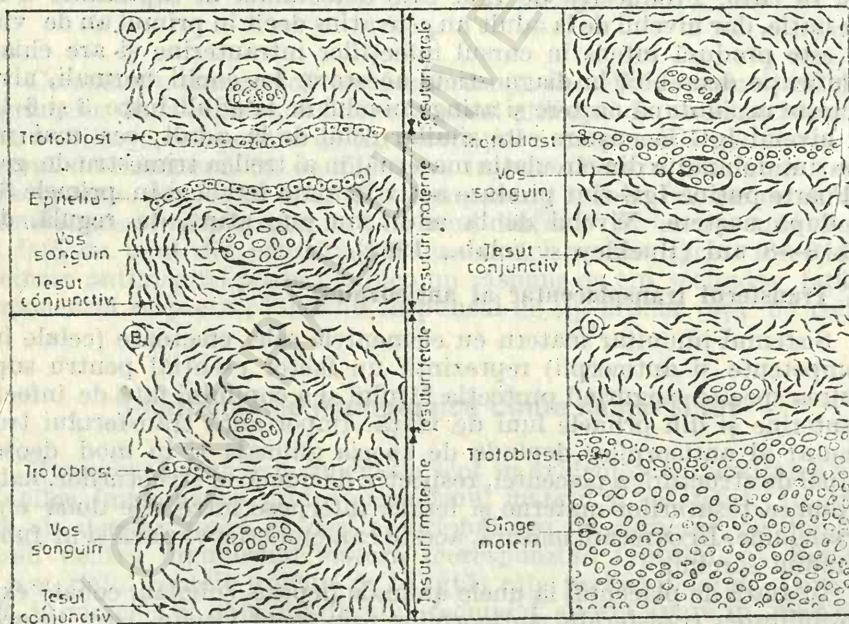


Fig. 190. — Tipurile de structură ale placentelor, cu implicații în transferul anticorpilor de la mamă la făt. A. Epiteliochorială, B. Sindesmochorială. C. Endoteliochorială. D. Hemochorială (după Gill, 1975).

În concluzie, posibilitatea transferului anticorpilor materni depinde de structura placentei și de profunzimea pătrunderii ei în țesuturile uterine. La speciile la care placenta se opune transferului, anticorpii sînt transmiși postnatal prin colostru și lapte. La animalele la care acest transfer are loc prenatal, laptele este practic lipsit de anticorpi materni (tabelul nr. 51).

Tabelul nr. 51

Căile de transfer ale anticorpilor materni la făt și la nou-născut

Specia animală	Transmiterea anticorpilor				
	Prenatală		Postnatală		
	Cantitatea	Calea	Cantitatea	Calea	Durata (zile)
Om, maimuță	+++	Placentă	–	–	–
Iepure, cobai	+++	Sac vitelin	–	–	–
Șoarece, șobolan	+	Sac vitelin	++	Intestin	16–20
Ciine, pisică	+	Necunoscută	++	Intestin	1–10
Oaie	–	–	+++	Intestin	1–2
Cal, vacă, porc	–	–	+++	Intestin	1–1,5

Aprecierea transferului se face comparînd prezența și nivelul anticorpilor specifici induși activ sau introduși pasiv (după marcare cu ^{131}I) de la mamă cu cei ai nou-născutului. Transferul Ig este un proces activ și selectiv pentru IgG cu excluderea IgA (deși are o greutate moleculară similară), a IgM, a IgD și a IgE. Ceva mai mult, există chiar o selectivitate pentru anumite subclase de IgG, ca, de exemplu, IgG1 și IgG3, care sînt transferate preferențial în dauna IgG2 și IgG4 (Virella și colab., 1972). Protecția conferită de anticorpii materni este doar parțială, deoarece nu implică decît prezența unei game restrînse de anticorpi diferiți, și, în plus, multe infecții necesită un răspuns mediat celular. În anumite limite, transferul de anticorpi încetinește dezvoltarea sistemului imunitar propriu. De aceea, copiii sînt vaccinați după cîteva luni de la naștere. Prin placentă pot trece accidental și unele celule ca, de exemplu, limfocitele materne sensibilizate la antigene. Nu se știe dacă supraviețuiesc sau dacă sînt funcționale la făt și la nou-născut. Copiii născuți prematur (în special înainte de 30 de săptămîni) au foarte puține IgG transmise transplacentar și sînt incapabili să producă activ anticorpi. Ei sînt expuși, ca și copiii slab dezvoltați în raport cu vîrsta sarcinii sau cu deficite nutritive *in utero*, unor infecții grave letale, datorită lipsei maturării celulelor T de reglare și a limfocitelor B.

Transferul anticorpilor în lapte

Relativ nesemnificativ la speciile care transferă anticorpi *in utero*, transferul în lapte este deosebit de important la rumegătoare, deoarece asigură protecția și supraviețuirea animalelor nou-născute, într-un mediu foarte infectat.

Colostrul diferă de lapte ca aspect și compoziție. El conține predominant Ig și albumine și relativ puține proteine caracteristice laptelui (cazeină, β-lactoglobuline etc.). Reprezintă un concentrat, printr-un

mecanism necunoscut, al Ig prezente la mamă, în perioada imediat anterioară nașterii. Glanda mamară are astfel funcții imunologice importante atît în protecția pasivă a sugarului, cît și în apărarea propriilor sale țesuturi de infecții. Aceste funcții diferă mult de la o specie la alta, în funcție de deosebirile fiziologice fundamentale dintre procesele de reproducere ale diferitelor organisme și de repartizarea funcțiilor esențiale între diferite organe în cursul evoluției (de exemplu, transferul anticorpilor predominant prin placentă la primate și respectiv prin glanda mamară la rumegătoare).

Laptele uman conține în principal IgA, produsă, după mulți autori, la nivelul sistemului imunitar al mucoaselor intestinale materne, care ar funcționa ca un mecanism protector integrat pentru copilul imunologic virgin expus unui „atac" violent al microorganismelor și moleculelor străine din mediu. Sintetizate de plasmocitele intestinale, IgA ar ajunge în glanda mamară pe calea circulației generale.

Phillips-Quagliata-Lamm (1987) acordă o mare importanță producerii IgA *in situ*, la nivelul glandei mamare, deși nu există probe privind pătrunderea antigenelor la nivelul ei. Există posibilitatea unei migrări a limfocitelor circulante, sensibilizate local față de diferite antigene, în glanda mamară, unde se diferențiază la plasmocite și secretă IgA. Unele argumente susțin acest punct de vedere: 1) numărul plasmocitelor din glanda mamară crește mult, la om și la animale în cursul sarcinii; 2) animalele care alăptează, expuse la antigene intestinale, au IgA specifice în lapte, dar nu și în ser; 3) plasmocitele din glanda mamară produc aproape exclusiv IgA; 4) s-a demonstrat, experimental, existența unui transfer enteromamar de limfocite B de la nivelul GALT, via sistemul limfatic mezenteric → canalul toracic → sînge; 5) celulele din ganglionii mezenterici (reprezentative pentru sistemul GALT), sensibilizate la anumite antigene, inoculate i.v. la șoarece, au tendința de a migra selectiv și de a se localiza rapid în glanda mamară în lactație, unde devin producătoare de IgA.

Laptele și colostrul conțin celule T și B, macrofage și granulocite. Aproximativ 5—10% din numărul total sînt celule T_H și T_S (Richie, 1982). Celulele T_H din glanda mamară ar stimula secreția de IgA și ar contribui la protecția țesutului glandular însuși. Cele din lapte ar facilita răspunsul imun mediat celular al nou-născutului. În plus, după ingestia laptelui care conține anticorpi, aceștia nu sînt absorbiți, dar acordă protecție pasivă mucoasei intestinale față de numeroasele microorganisme cu care aceasta vine permanent în contact.

Imunologia nou-născutului uman

Deși dezvoltarea sistemului limfoid este inițiată la sfîrșitul primului trimestru de gestație, nou-născutul nu este integral imunocompetent. Produsul normal, sănătos, al unei sarcini la termen, necomplicate, are un sistem imunitar neexperimentat și imatur, deoarece a petrecut 40 de săptămîni înconjurat de un mediu lichid, steril. El prezintă, în general, pentru cîteva săptămîni sau luni, hipogamaglobulinemie. Celulele sale, T și B circulante, au particularități intermediare între formele imature, nefuncționale, și cele mature. Deși cooperarea T — B, capacitatea de a

recunoaşte substanţele străine, de a prolifera ca răspuns la ele şi de a declanşa un răspuns citotoxic sînt similare celor de la adult, funcţia limfocitelor la naştere este departe de cea de la organismele mature.

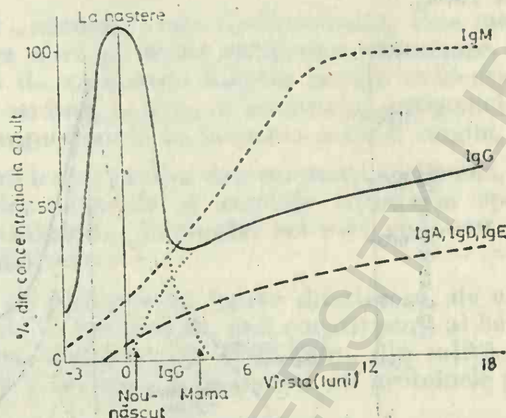


Fig. 191. — Evoluţia titrului seric al imunoglobulinelor la organismele fetale şi la nou-născuţii umani (după Roitt, 1976).

Capacitatea de a sintetiza şi secreta Ig după naştere urmează acelaşi mod de exprimare izotipică observat în ontogenie, după secvenţa : IgM → → IgG → IgA. Valorile de la adult sînt însă atinse tîrziu : după ~1 an pentru IgM, după 5—6 ani pentru IgG, după 7—9 ani pentru IgE, după 10—12 ani pentru IgA circulante şi numai după 2—4 ani pentru SIgA, deşi sinteza acestora începe în perioada neonatală (Losonsky şi Ogra, 1984), (fig. 191). Creşterea sintezei diferitelor Ig este influenţată de diferitele infecţii intercurente, după cum demonstrează, pe de o parte, creşterea foarte lentă a titrului la animalele axenice („germ-free"), şi invers, apariţia anormal de rapidă a Ig la copiii infectaţi *in utero*. Deoarece celulele B care poartă IgG şi IgA asociate cu membranele au fost găsite cu aceeaşi frecvenţă ca la adult, încă de la jumătatea perioadei de gestaţie, aceste particularităţi nu pot fi atribuite apariţiei in timp a limfocitelor B precursoare. Ele sînt mai degrabă determinate de unele funcţii deficitare ale celulelor B şi intervenţiei celulelor T, cu funcţii de reglare în exprimarea izotipurilor de Ig. În acest sens, pledează unele observaţii experimentale :

1) Efectul helper al celulelor T provenite de la un nou-născut, în co-cultură cu celulele B de adult, este mai puţin eficient pentru IgG şi IgA, decît pentru IgM.

2) Celulele B de la nou-născut răspund mai intens la celule T provenite de la adulţi, decît la celule T de nou-născut, deşi rămîn deficitare în producerea de IgG şi IgA. Aceasta demonstrează o relativă incapacitate a celulelor B de la nou-născut de a produce IgG şi IgA.

3) Celulele T de la nou-născut exercită o acţiune predominant supresoare pentru anumite clase de Ig.

Datorită acestor particularităţi nivelul IgG, la naştere asemănător sau chiar puţin mai mare decît cel matern, este urmat de o scădere

iziologică între 3 şi 6 luni postpartum, corelată cu o deficienţă imunitară relativă. Fenomenul este determinat de o scădere a concentraţiei Ig transferate de la mamă (prin catabolism), care este numai parţial compensată de sinteza endogenă, stimulată de expunerea la antigenele din mediu. (Cebra, 1984).

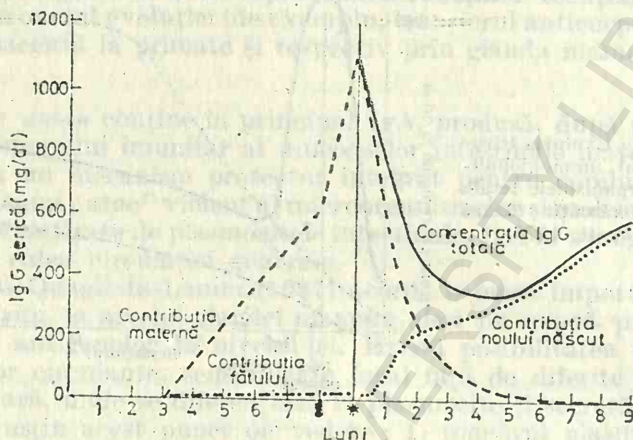


Fig. 192. – Evoluţia titrului IgG seric, în raport cu vîrsta la om. Graficul evidenţiază contribuţia relativă a organismului fetal şi a celui nou-născut, în comparaţie cu cea a organismului matern (din Stiles şi colab., 1984).

Odată cu înaintarea în vîrstă, organismele devin mai bine echipate pentru a produce un răspuns imun corespunzător, datorită unei mai bune funcţionări a constituenţilor sistemului imunitar şi în parte de creşterea progresivă a memoriei imunologice. La om, răspunsul imun este optim în jurul vîrstei de 10 ani, care corespunde şi perioadei în care ţesuturile limfoide ating o dezvoltare maximă (fig. 192). După această perioadă are loc o reducere semnificativă a organelor limfoide centrale şi, corespunzător, o diminuare a producerii de limfocite imunocompetente noi.

Anticorpii „naturali"

Sub această denumire sînt reunite toate categoriile de anticorpi prezenţi în sîngele animalelor normale neimunizate şi care au capacitatea de a se combina cu diferite antigene potenţiale, nu însă şi cu moleculele „self" proprii organismului respectiv. Ei au o serie de proprietăţi fizice, chimice şi biologice similare celor ale anticorpilor prezenţi în concentraţii mult mai mari după imunizare. Au însă o afinitate mai mică decît anticorpii imuni, deşi producerea lor (cu cantităţi mici de antigene) ar trebui, în mod normal, să favorizeze o afinitate mare. Explicaţia este dată de faptul că imunogenii care i-au produs prezintă determinanţi antigenici înrudiţi şi nu identici cu cei folosiţi pentru evidenţierea şi dozarea lor.

Anticorpii „naturali" au fost descrişi la toate speciile de vertebrate studiate: peşti, amfibieni, reptile, păsări, mamifere etc. Ei reacţionează cu o gamă foarte largă de antigene incluzînd: bacteriofagi, virusuri animale, bacterii, protozoare, metazoare parazite, eritrocite şi chiar cu

unele antigene self, normal „sechestrate", cum sînt cele din spermatozoizi şi din unele extracte de organe. Probabil că aceşti autoanticorpi „naturali" au un rol semnificativ în îndepărtarea moleculelor provenite din celulele moarte şi din alte materiale nedorite.

Originea anticorpilor „naturali" este controversată. Cele mai multe date pledează pentru ideea unei stimulări antigenice anterioare, cel mai adesea nedectată, produsă de antigenele folosite pentru evidenţierea lor sau de alte macromolecule străine, care au determinanţi antigenici comuni cu antigenele-test. Între argumentele în favoarea acestei origini, cităm :

1) Existenţa în natură a mai multor determinanţi antigenici, comuni microorganismelor, celulelor vegetale şi animale situaţi în special în structura mai multor polizaharide. Exemplul cel mai cunoscut este cel al antigenelor heterofile Forssman.

2) Unele substanţe de provenienţe foarte diferite ca, de exemplu, polizaharidul de tip XIV de la pneumococ, unii constituenţi ai bacteriilor Gram-negative sau din mucoasa gastrică de la porc, din salivă sau din epiteliul stomacal de la cal reacţionează încrucişat cu proteinele grupului sanguin A.

3) Animalele axenice („germ-free") au un nivel scăzut de Ig, chiar la vîrstă adultă. În cursul dezvoltării lor, dacă sînt menţinute în camere sterile şi sînt hrănite cu o dietă lipsită de antigene (hidrolizate de proteine), anticorpii „naturali" nu se formează spontan. În schimb, Ig apar dacă animalele sînt transferate în sisteme de creştere convenţională sau dacă sînt imunizate.

După Landsteiner (1945), Kershaw (1949) etc., anticorpii naturali ar putea avea şi o origine „genetică" în sensul că ar putea apărea în ser foarte timpuriu în cursul vieţii, ca o reflectare a unui proces normal şi inevitabil de maturare a organismului (organismele animale sînt expuse permanent ingestiei sau inhalării de antigenele virale sau bacteriene).

Semnificaţie. Anticorpii „naturali" pot influenţa favorabil procesul de fagocitoză, prin stimularea polimorfonuclearelor neutrofile (imunofagocitoză). De asemenea, ei ar putea reacţiona cu antigenele în faza iniţială a răspunsului imun. Datorită prezenţei lor, imunizarea organismelor cu anumite antigene (de exemplu, hematiile de berbec) nu este, în realitate, în practică, o imunizare primară.

Inflamaţia

„Notae vero inflammationis sunt quatuor, rubor et tumor, cum calore et dolore".

A. C. CELSUS (42 î.e.n—32 e.n.)
De re medicinae

Inflamaţia (l. „inflammare" — a arde) este unul dintre cele mai importante mecanisme de apărare a organismelor animale. Ea reprezintă reacţia complexă a ţesutului vascularizat la diferite agresiuni, care inter-

cepteazā acţiunea agenţilor patogeni şi participă la repararea ţesutului lezat. Fenomen fără de care mamiferele nu pot supravieţui (Heymer, 1985), inflamaţia poate deveni, în cazul că nu este prompt atenuată, după indepărtarea agentului inductor, mai degrabă dăunătoare. Scăpate de sub un control riguros, reacţiile inflamatorii pot determina leziuni tisulare tranzitorii sau permanente, deosebit de importante, deoarece graniţa dintre efectele benefice şi cele dăunătoare este adesea foarte apropiată.

Inflamaţia reprezintă, în acelaşi timp, cel mai vechi mecanism filogenetic al rezistenţei faţă de agenţii patogeni. După cum a demonstrat Metchnikoff (1882), prima reacţie de apărare a metazoarelor primitive (*Daphnia magna*) faţă de infecţia cu *Metchnikovia (Monospora) bicuspicata* este mobilizarea amoebocitelor la locul agresiunii, urmată de fagocitarea agentului patogen. Fenomenul este mult complicat la mamifere şi la om, prin intervenţia şi interacţiunea dintre mai multe categorii de celule şi mediatori, care nu exclud participarea celor ce aparţin sistemului imunitar. El implică intervenţia unor factori vasculari, celulari, umorali, neuroendocrini şi o serie de interrelaţii între ei, care fac ca procesul inflamator să aibă un caracter dinamic marcat, evoluînd ca o adevărată cascadă de evenimente.

Reacţiile inflamatorii pot fi determinate de: 1) agenţi infecţioşi (virusuri, microorganisme) sau de infestări parazitare; 2) substanţe chimice (acizi, toxine, produse farmaceutice etc.); agenţi fizici (căldură, radiaţii, corpuri străine); 4) necroze tisulare, acumulări de mucus, colesterol etc.; 5) cauze imunologice (reacţii imunitare alergice); 6) anumite stări patologice (în special tumori carcinoide, afecţiuni diferite articulare, traumatisme). Agenţii patogeni infecţioşi pot induce reacţii inflamatorii fie direct, interacţionînd cu ţesutul expus, fie indirect, declanşînd sinteza şi/sau activarea unor mediatori endogeni, răspunzători de iniţierea inflamaţiei. În primul caz, evoluţia reacţiilor inflamatorii reflectă aproape exclusiv proprietăţile agentului patogen, în timp ce în al doilea caz, în special, pe cele ale mediatorilor eliberaţi. În cazul agenţilor patogeni infecţioşi, declanşarea inflamaţiei este condiţionată de depăşirea mecanismelor naturale ale rezistenţei naturale (în primul rînd, pielea, adevărat organ imunitar superficial, datorită numărului mare de celule cu rol în imunitate şi inflamaţie). De asemenea, agenţii patogeni trebuie să reziste mecanismelor efectoare specifice, declanşate de determinanţii lor antigenici, care tind să-i neutralizeze şi să-i elimine imediat după ce au pătruns în organism. Tipul răspunsului inflamator, intensitatea, evoluţia şi sfîrşitul său depind de natura agenţilor etiologici (viu sau neanimat, toxic sau inert, imunogen sau neimunogen), de durata expunerii sau de persistenţa cronică, dar şi de natura şi localizarea ţesutului afectat, de reactivitatea şi starea de imunocompetenţă a gazdei.

În funcţie de particularităţile de evoluţie clinică şi de modificările morfologice şi biochimice au fost descrise două tipuri distincte de inflamaţii:

Inflamația acută

Este determinată de stimuli de scurtă durată, ca, de exemplu, de unele bacterii care sînt relativ rapid distruse de forțele de apărare. În cursul acestei faze lezarea unor celule sau țesuturi amorsează eliberarea de mediatori chimici, care determină modificări hemodinamice, legate de viteza fluxului sanguin și de calibrul vaselor, asociate cu creșterea permeabilității vasculare, în special, la nivelul venulelor postcapilare, de producerea de exsudat de plasmă și proteine plasmatice în compartimentul extravascular, de migrarea leucocitelor etc.*

Celor patru semne esențiale, descrise de Celsus la începutul erei noastre, hipertermia (calor), roșeața (rubor), tumefierea (tumor) și durerea (dolor), Galenus le-a adăugat după ~130 de ani un altul reprezentat de alterările tisulare, care pot merge pînă la necroză.

Modificările tisulare locale. Fenomenele vasculare sînt localizate inițial în venulele postcapilare, al căror endoteliu formează o barieră selectivă între sînge și țesuturi. Ele sînt asociate cu o îngrămădire de celule („Hotch-potch”) de diferite tipuri, dispuse fără nici o aranjare logică (Heymer, 1985). În cazul în care modificările nu au o compoziție distinctă și un aranjament caracteristic al celulelor în teritoriul afectat inflamația este numită nespecifică. La început, tipul celular predominant este reprezentat de neutrofile. La scurt timp după începutul inflamației devin preponderente macrofagele, care sînt foarte active în îndepărtarea agenților patogeni și în degradarea, după înglobare, a bacteriilor și a celulelor moarte. Vindecarea este asociată cu dispariția exsudatului extravascular prin drenarea limfei, îndepărtarea resturilor celulare distruse și apariția fibroblaștilor, care sintetizînd colagen asigură repararea leziunilor locale. În același timp în teritoriul expus inflamației au loc modificări biochimice importante: staza intracapilară creează condiții de hipoxie sau anoxie locală, de predominanță a metabolismului anaerob, cu producere de acid lactic și acidoză tisulară. Acumularea de substanțe chemotactice face ca numeroase granulocite să margineze, să adere și să treacă în spațiile extravasculare (fig. 193).

Acumularea locală de mediatori ai inflamației sau de substanțe provenite din clivarea unor proteine plasmatice, determină alterări ale sistemului limfatic și trecerea în circulație a unor substanțe ce vor acționa la distanță. Apar astfel, cefaleea, febra, modificările în activitatea țesuturilor hematopoetice sau a celulelor în care sînt sintetizați reactanții fazei acute. Se acumulează, de asemenea, o cantitate mare de substanțe bactericide și citocide, interferoni, proteine cationice, enzime, radicali ai O_2, lactoferină, lizozim, lipoproteine cu densitate mare etc. (fig. 194).

În cazurile în care răspunsul inflamator nu este prompt și suficient de activ și îndepărtarea agenților infecțioși nu are loc, inflamația poate deveni cronică și poate determina leziuni ireversibile.

Rolul principalelor celule implicate în inflamație. Inflamația reprezintă rezultatul final al unui proces multifactorial, care implică partici-

* Pentru detalii vezi cap. „Fagocitoza”.

parea mai multor tipuri de celule (neutrofile, macrofage, mastocite, bazofile, eozinofile, plachete etc.), precum și a unui număr mare de mediatori farmacologic activi.

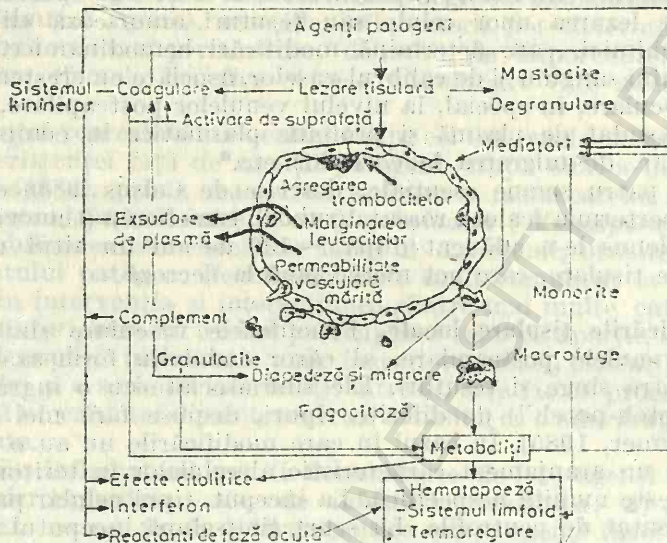


Fig. 193. — Reprezentare schematică a modificărilor celulare și umorale asociate cu reacția inflamatorie (după Fauve, 1970).

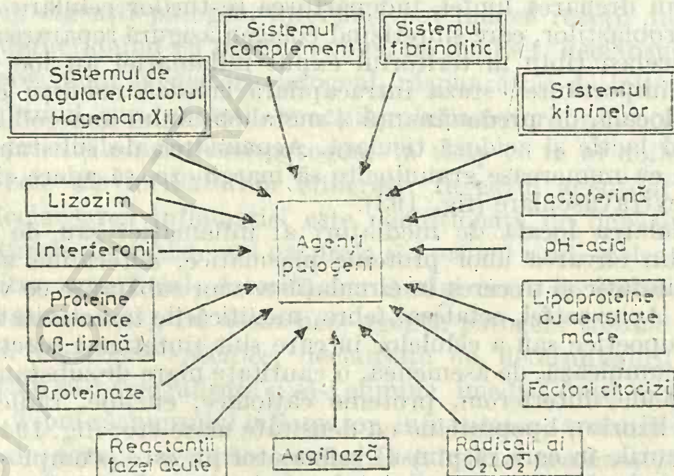


Fig. 194. — Reprezentare schematică a diferitelor sisteme enzimatice (în casete cu contur dublu) și produși secundari ai inflamației implicați în apărarea organismelor față de agenții patogeni (după Fauve, 1980).

Neutrofilele reprezintă elementele de șoc, active din prima fază a inflamației (primele 1—2 ore). Ele migrează prin membrana bazală a endoteliilor, trec în teritoriul inflamat unde înglobează bacteriile și le

degradează în fagolizosomi. În acelaşi timp, eliberează enzime şi mediatori, care amplifică procesul inflamator local. Astfel, ele sintetizează leukotriena LTB4, cu acţiune asupra lor înşile, facilitînd chemotaxia, chemokineza şi aderenţa vasculară a altor neutrofile („neutrofilia atrage neutrofilia"). În anumite circumstanţe, neutrofilele eliberează enzime hidrolitice lizosomale, care singure sau împreună cu diferiţi produşi metabolici citotoxici proprii (H_2O_2, O_2^-, etc.) pot leza grav ţesuturile adiacente focarului inflamator (fig. 195).

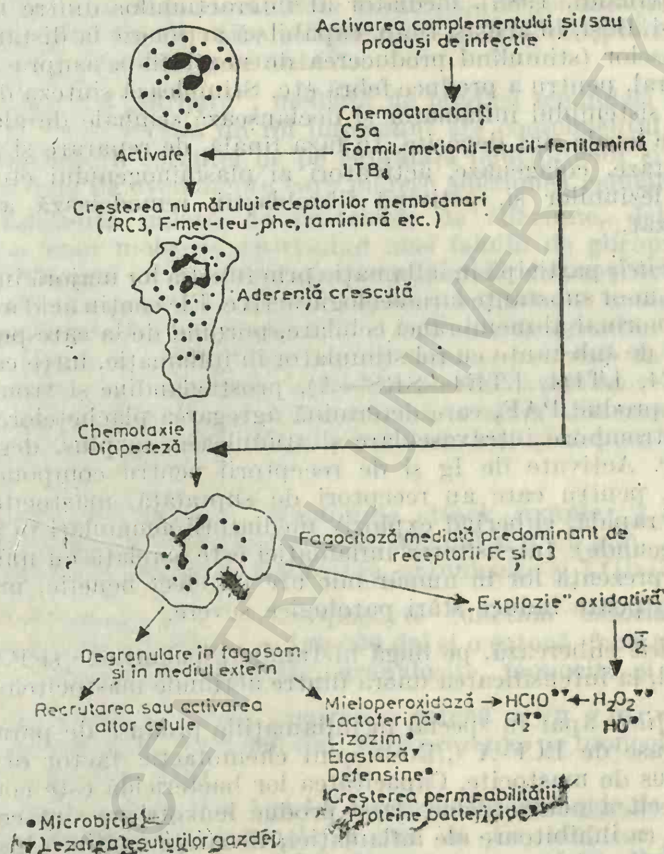


Fig. 195. — Răspunsul polimorfonuclearelor neutrofile la infecţii sau la alţi factori capabili să inducă procese inflamatorii (după Malech şi Gallin, 1987).

După Bainton (1980), liza neutrofilelor se poate realiza pe mai multe căi: 1) prin acţiunea unor agenţi toxici exogeni (streptolizină); 2) liza din interior („Lysis from within"), prin cristale de urat monosodic; 3) prin „regurgitare după hrănire"; 4) prin „fagocitoză frustrată" produsă de aderenţa de un „obiect" prea mare pentru a fi endocitat; 5) prin contact cu anumiţi constituenţi ai sistemului complement.

Macrofagele, care reprezintă celulele-cheie ale inflamației, devin predominante numeric după o zi. Atrase de factorii chemotactici, favorizate de vasodilatație și de permeabilitatea vasculară mărită, ele desfășoară o activitate deosebit de intensă: 1) fagocitoză și imunofagocitoză; 2) eliberare de enzime degradative; 3) sinteză și eliberare de lizozim cu acțiune asupra peretelui celular bacterian; 4) sinteză de constituenți ai sistemului complement etc.

Macrofagele sintetizează și eliberează IL-1, un adevărat hormon de inflamație (Gualdi, 1985), mediator al interacțiunilor dintre macrofage, celulele T și B și, în același timp, capabil să acționeze la distanță asupra măduvei oaselor (stimulînd producerea de neutrofile), asupra sistemului nervos central, pentru a produce febră etc. Stimulează sinteza de compuși sanguini ai sistemului inflamator și declanșează semnale de alarmă cînd mecanismele locale sînt depășite. În faza finală, de reparare și vindecare, produc elastaze, colagenaze, activatori ai plasminogenului etc., asigură debridarea leziunilor și, activînd fibroblaștii, remodelează arhitectura țesutului lezat.

Mastocitele participă în inflamație prin funcția lor majoră în organism de secreție a unor substanțe farmacologic active. Ele conțin acid arahidonic, component normal al membranei celulare, pornind de la care pot fi sintetizate > 20 de substanțe cu rol stimulator în inflamație, între care leukotriene (LTC4, LTD4, LTE4—SRS—A), prostaglandine și tromboxani*. Mastocitele produc PAF, care determină agregarea plachetelor, vasodilatație, microtromboze intravasculare și stimulează, în plus, degranularea mastocitelor. Activate de Ig și de receptorii pentru componenții C3b, C3a și C5a, pentru care au receptori de suprafață, mastocitele suferă degranulare rapidă, eliberînd exploziv mediatorii acumulați în granulații (în cîteva secunde). Intensitatea inflamației este corelată cu numărul lor. În timp ce prezența lor în număr mic are un efect benefic, prezența în număr mare poate induce stări patologice severe.

Bazofilele eliberează, pe lîngă histamină, leukotriene și PAF, participînd, astfel, la intensificarea unora dintre acțiunile mastocitelor.

Eozinofilele apar în special în inflamațiile produse de paraziți și de alergeni, atrase de ECF-A („Eosinophil chemotactic factor of Anaphylaxis") produs de mastocite. Capacitatea lor bactericidă este considerabil mai mică decît a neutrofilelor. Deși produc leukotriene sînt considerate mai degrabă ca inhibitoare ale inflamației, deoarece conțin o histaminază și probabil leukotriene care inhibă degranularea. Fagocitează complexele imune cu IgE.

Plachetele sanguine participă în inflamație datorită tendinței lor de a adera la endotelii, de a se insinua în spațiile dintre celulele endoteliale, de a se agrega și participa la formarea de microtrombusuri, precum și prin capacitatea lor de a elibera histamină și serotonină.

Rolul fenomenelor de adeziune în inflamație. Interacțiunile „adezive" au o importanță fundamentală într-un larg spectru de funcții ale mono-

* Pentru detalii vezi cap. „Hipersensibilitatea".

citelor, neutrofilelor și limfocitelor, care contribuie la apărarea gazdei. Experimental, s-a demonstrat că mobilizarea monocitelor și a neutrofilelor *in vivo* este influențată de natura interacțiunii dintre ele și substraturi, bazată pe fenomene de adeziune. Utilizînd tehnica fotografierii la intervale regulate de timp, Atherton și Born (1972) au demonstrat că înainte de a părăsi capilarele neutrofilele aderă de preferință de endoteliul vascular, adiacent situsului inflamat.

Au fost descrise trei mecanisme de aderență a celulelor implicate în apărare (Springer și Anderson, 1986):

1) Aderența bacteriilor opsonizate de neutrofile, premergătoare înglobării lor prin endocitoză. Este favorizată de recunoașterea specifică a microorganismelor de către celulele care poartă receptori membranari pentru Ig și pentru componentul C3.

2) Aderența „dirijată", mediată de produși secundari ai procesului inflamator. Între aceștia un rol important are componentul C5a, care se leagă de receptorii specifici de pe suprafața neutrofilelor și monocitelor, inițiind o serie de evenimente care măresc adeziunea celulară.

3) Aderența indusă de proteinele de adeziune, determinată de intervenția unor molecule aparținînd unei familii de glicoproteine, care, acționînd sinergic cu receptorii sau independent de aceștia, mediază sau reglează diferite reacții de aderență ale neutrofilelor și monocitelor, ca și interacțiunile adezive ale celulelor T și NK. Aceste proteine sînt alcătuite din două tipuri de subunități, α și β, asociate necovalent. O parte din ele sînt dispuse pe suprafața celulelor. Restul (cantitativ de 5—10 ori mai numeroase) sînt stocate într-o rezervă celulară, din care pot fi mobilizate rapid sub influența stimulilor inflamatori și depuse pe suprafața celulelor.

Glicoproteina Mac-1 („*M*embrane *a*ttack *c*omplex") conține două tipuri de subunități : α cu g.m. ~ 170 000 dal și β cu g.m. ~ 95 000 dal. Este prezentă pe monocite, macrofage, granulocite și LGL (NK).

Glicoproteina LFA („Lymphocyte function associate antigen") conține o catenă α, cu g.m. ~ 180 000 dal și o catenă β cu g.m. ~ 95 000 dal. Este prezentă pe limfocite, granulocite, monocite și celulele NK.

Glicoproteina p 150,95 conține o catenă α cu g.m. ~ 150 000 dal și o catenă β cu g.m. ~ 95 000 dal. Este prezentă pe monocite, macrofage și granulocite (fig. 196).

Catenele α de la Mac-1 și LFA prezintă o omologie de 35%. La cele trei tipuri de proteine, catenele β par să fie identice, iar catenele α și β formează complexe α 1 β 2, dispuse pe suprafața celulei, în pachete discrete, rezultînd din fuziunea localizată a granulațiilor specifice (la neutrofile) sau a altor vezicule secretorii, care conțin Mac-1, LFA și p 150,95, cu membrana celulară. În cursul procesului inflamator are loc o polarizare a acestor „pachete" de proteine de aderență la nivelul punctului de fuziune, care va iniția și consolida adeziunea neutrofilului de substrat. Migrarea celulelor este deci asociată cu procesul de polarizare a proteinelor de adeziune (care mediază legarea), alternînd cu difuzia lor în planul celulei, ce determină diminuarea concentrației într-o regiune și implicit

scăderea afinității de legare. Cum fiecare granulocit are ~1000 granulații specifice, procesul se poate repeta de mai multe ori.

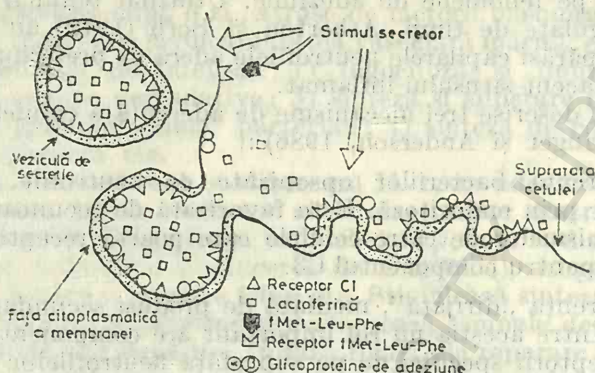


Fig. 196. — Mobilizarea veziculelor secretoare în granulocite. Sub acțiunea unor stimuli diferiți (C5a, ionofori, f. Met-Leu-Phe, forbol-miristat-acetat (PMA)) sînt mobilizați pe suprafața celulei sau secretați o serie de compuși cu rol important în inflamație (după Springer și Anderson, 1986).

Următoarele argumente pledează pentru rolul esențial al proteinelor de aderență în inflamație:

1) Stimulii inflamatori și substanțele chemoatractante (Met-Leu-Phe, C5a, substanțele secretagoge (Phorbol-miristat-acetat, ionoforul/ Ca^{2+})) stimulează de 5—10 ori expunerea lor pe suprafața celulelor;

2) Bolnavii cu deficit în sinteza Mac-1 și p 150,95 fac infecții recurente grave, asociate cu alterarea funcției de mobilizare a leucocitelor și a diapedezei. În cazul infecției mucoaselor și a pielii, fac frecvent leziuni necrotice și ulcerative;

3) Scăderea cantității de proteine de aderență, pe suprafața neutrofilelor este asociată cu incapacitatea de a migra în focarul inflamator și de a produce puroi. Ea este determinată de incapacitatea celulelor respective de a amplifica exprimarea Mac-1 și p 150,95 ca răspuns la stimulii inflamației.

Rolul mediatorilor farmacologic activi. Participarea unor mediatori în patogenia inflamației este sugerată de următoarele particularități:

1) asemănarea mare a reacțiilor față de o mare varietate de stimuli declanșatori diferiți ai procesului inflamator;

2) existența unei perioade de latență între agresiune și răspuns (necesar pentru sinteza și/sau eliberarea substanțelor endogene);

3) prezența în țesuturile lezate a unor substanțe de proveniență endogenă care, izolate, sînt capabile să inducă modificări caracteristice inflamației acute (vasodilatație, permeabilitate vasculară mărită, migrare celulară etc.).

Teoretic, principalele criterii pentru aprecierea calității de mediator sînt următoarele:

1) prezența sa constantă în leziunile spontane sau produse experimental;

2) reproducerea experimentală a leziunii cu ajutorul substanței incriminate după zolare;

3) suprimarea reacției inflamatorii cu ajutorul inhibitorilor specifici ai mediatorului;

4) reproducerea leziunii, cu ajutorul mediatorului obținut prin sinteză chimică;

5) imposibilitatea producerii unui răspuns inflamator intens la animalele cu deficiență în producerea lui.

Numărul substanțelor izolate și incriminate ca mediatori ai inflamației este atît de mare, încît justifică afirmația lui Ryan și Majno (1977), după care „după cît se pare, a pescui mediatori ai inflamației a devenit un sport internațional". Întrucît numai foarte puțini mediatori izolați îndeplinesc condițiile menționate, problema esențială nu este dacă ei există, ci care dintre toate substanțele descrise este efectiv activă *in vivo*. Tabelul nr. 52 prezintă cîțiva dintre mediatorii mai cunoscuți și rolul lor *in vivo* *.

Tabelul nr. 52

Acțiunea principalilor mediatori farmacologic activi în inflamație

Categoria	Mediatorul tip	Sursa	Efectele majore în inflamație
Amine vasoactive	Histamina (β-imidazol-etilamina) Serotonina (5-hidroxi-triptamina)	Mastocite; bazofile; trombocite Mastocite; trombocite; celule entero-cromafine	Permeabilitate vasculară mărită (venule) Contracția mușchilor netezi
Sistemul complement	C3a, C5a	Plasmă sanguină	Degranularea mastocitelor; chemotaxia celulelor inflamatorii; stimularea indirectă a activității neutrofilelor și producerea de radicali ai O_2
Kinine	Bradikinina	Plasmă sanguină	Vasodilatație; creșterea permeabilității vasculare; durere
Interleukine (limfokine)	IL-1 (monokine) MIF, MAF	Macrofag Limfocite T	Febră; induce sinteza de PG și colagenaze; proliferarea fibroblaștilor Inhibarea migrării și respectiv activarea macrofagelor

* Pentru detalii vezi cap. „Hipersensibilitatea"

Tabelul nr. 52 (continuare)

Categoria	Mediatorul tip	Sursa	Efectele majore în inflamaţie
Interferoni	IFN γ	Limfocite T	Activarea macrofagelor; modularea reacţiilor imunitare
Prostaglandine (PG)	PGE 2	Mastocite	Vasodilataţie; potenţează efectele histaminei, serotoninei şi leukotrienelor.
Leukotriene	SRS-A (LTC4, LTD4, LTE4)	Mastocite	Contracţia muşchilor netezi; măresc permeabilitatea vasculară; durere; febră
	LTB4	Mastocite	Chemotaxia neutrofilelor, măresc permeabilitatea vasculară (cu PGE 2); stimulează adeziunea de capilare
Factorul activator al plachetelor	PAF ("Platelets activator factor")	Bazofile; neutrofile; monocite; macrofage	Eliberează mediatorii din trombocite; degranularea mastocitelor; agregarea plachetelor şi neutrofilelor; coagularea intracapilară; producerea de superoxid de neutrofile
Fibrinopeptide	Produşi de degradere ai fibrinei	Sistemul de coagulare	Permeabilitate vasculară mărită; chemotaxie; intensifică efectele bradikininei

Unele dintre substanţele citate (aminele vasoactive şi kininele) afectează în special vasele sanguine şi sînt active, în mod deosebit, în inflamaţiile acute. Altele (limfokinele) acţionează asupra celulelor şi au un rol predominant în inflamaţia cronică.

Rolul factorului Hageman. Factorul XII Hageman al sistemului de coagulare are un rol-cheie prin capacitatea sa de a contribui la activarea a patru sisteme care prezintă interacţiuni esenţiale cu inflamaţia; 1) sistemul de coagulare; 2) sistemul fibrinolitic; 3) sistemul complement şi 4) sistemul kininelor.

În condiţii normale, el este inert, fapt decisiv pentru menţinerea homeostaziei fiziologice.

Activarea lui este realizată prin:

1) alterări ale endoteliilor vasculare, urmate de moartea sau de liza celulelor din cauza depolarizării membranei celulare prin proteoliză de origine lizosomală, scăderii de pH sau fixării complexelor imune, asociată cu acţiunea litică a sistemului complement;

2) leziuni ale colagenului sau interacţiuni cu celule (granulocite, macrofage, trombocite), care alterează continuitatea endoteliului, însinuîndu-se între celulele acestuia. Datorită discontinuităţilor apărute în

structura peretelui vascular şi modificărilor de sarcină electrică, peretele îşi pierde caracterul „siliconat", devenind biologic identic cu suprafaţa unei sticle;

3) prezenţa unor mucopolizaharide alterate, a cristalelor de urat de Na etc.;

4) prezenţa complexelor imune (activare directă, atît în reacţiile inflamatorii imunitare clasice, cît şi în cele de hipersensibilitate).

Acţiunea asupra sistemelor de coagulare. Factorul XII activat (XIIa) reacţionează cu factorul XI PTA („Plasma thromboplastic antecedent") cu care formează un complex activ pe factorul IX. Acesta, împreună cu factorul VIII, în prezenţa fosfolipidelor plachetare şi a Ca^{2+}, activează factorul X, care în asociere cu factorul V, Ca^{2+} şi fosfolipidele transformă protrombina în trombină.

Trombina (enzimă proteolitică) hidrolizează fibrinogenul la monomere de fibrină, care, cu ajutorul factorului XII, sînt polimerizate la fibrină stabilă. În cursul formării fibrinei se formează fibrinopeptide cu rol activ în inflamaţie.

Acţiunea asupra sistemului fibrinolitic. Factorul XIIa, în asociere cu un cofactor activator, acţionează pentru a stimula sistemul fibrinolitic, transformînd plasminogenul în plasmină. Aceasta exercită o acţiune litică pe numeroase substraturi, între care fibrinogenul şi fibrina. În cursul activării plasminogenului la plasmină sînt eliberate plasminopeptide, în timp ce în cursul degradării fibrinogenului şi a fibrinei se eliberează produşi de degradare a fibrinei (PDF). Prin aceste mecanisme, aceleaşi substanţe care declanşează formarea cheagurilor sînt la originea sistemelor biochimice care le distrug (fig. 197).

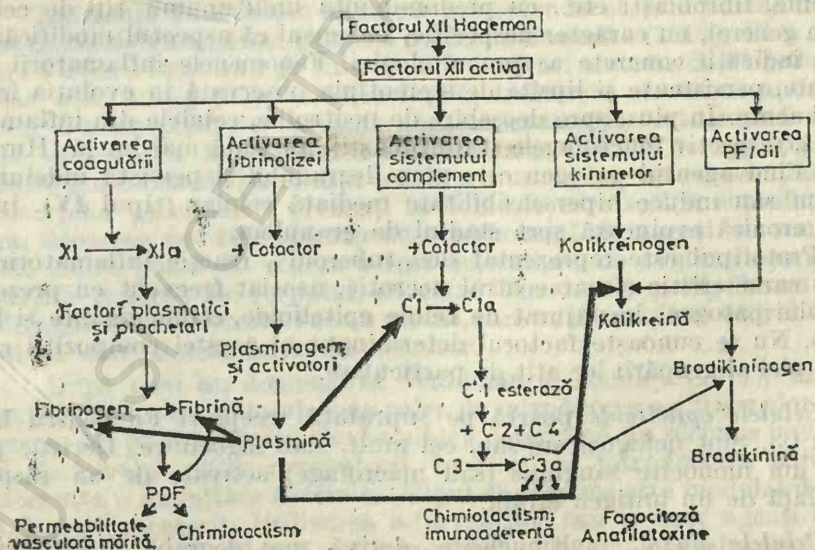


Fig. 197. — Rolul factorului XII Hageman în activarea diferitelor sisteme biologice şi consecinţele acestui proces.

Acțiunea asupra sistemului complement. Factorul XII activează sistemul complement fie direct, fie prin intermediul plasminei. Se eliberează compuși cu activitate de kinine (C2), chimiotactică și capacitate de imunoaderență.

Acțiunea asupra sistemului kininelor se realizează pe mai multe căi: 1) direct, asupra activatorilor kalikreinogenului; 2) prin intermediul plasminei; 3) prin participarea factorului XII la elaborarea PF/dil, substanță proteolitică activă asupra permeabilității vasculare. Ea transformă kalikreinogenul la kalikreină, stimulînd producerea de kinine vazoactive. În aceste procese, factorul XII se comportă ca o enzimă activă pe cinci substraturi diferite: factorul XI (PTA), cofactorul fibrinolizei, PF/dil, kalikreinogen și componentul C1 al sistemului complement. Prin acest mecanism, mai multe sisteme biologice (inflamator, fibrinolitic, imunitar și inflamator) au un inițiator comun.

Rolul răspunsului imun. Asocierea frecventă a răspunsului imun umoral și celular intensifică reacțiile de apărare ale organismului dar, în același timp, modifică tipul și intensitatea fenomenelor inflamatorii. Dovada o constituie și faptul că la bolnavii cu deficit imunitar sever, bacteriile piogene nu produc infecții piogene, ci induc, de regulă, leziuni hemoragice necrozante, granulomatoase etc. (Shevac, 1984).

Inflamația cronică

Indusă de agenți patogeni care rezistă *in vivo* și persistă în țesuturi perioade mai îndelungate de timp, inflamația cronică este lipsită de modificările hemodinamice atît de evidente în inflamația acută. Ea este caracterizată prin infiltrarea țesutului cu macrofage, limfocite, plasmocite, eozinofile, fibroblaști etc., cu predominanța unui anumit tip de celule, dar, în general, cu caracter nespecific, în sensul că aspectul modificărilor nu dă indicații concrete asupra etiologiei. Fenomenele inflamatorii sînt atenuate, persistente și lipsite de stereotipia observată în evoluția inflamației acute. În plus, spre deosebire de neutrofile, celulele din inflamația cronică, respectiv macrofagele și fibroblaștii, au viață mai lungă (Hurley, 1983). Cînd agentul patogen este greu degradabil și persistă îndelungat în țesut sau induce hipersensibilitate mediată celular (tipul IV), inflamația cronică evoluează spre stadiul de granulom.

Prototipul este reprezentat de „tubercul", reacție inflamatorie cu aspect caracteristic (focar central necrotic, asociat frecvent cu prezența agentului patogen, înconjurat de celule epitelioide, celule gigante și limfocite). Nu se cunoaște factorul determinant al acestei compoziții celulare și nici al grupării lor atît de particulare.

Celulele epitelioide poartă pe suprafață receptori Fc pentru Ig și pentru C3. Sînt nefagocitare sau, cel mult, slab fagocitare. Derivă, probabil, din monocite sanguine (sau macrofage) activate de un răspuns imun față de un antigen străin.

Celulele gigant, multinucleate, derivă mai degrabă din fuziunea macrofagelor decît din diviziunea lor. Aparțin la două tipuri: 1) celule

Langhans cu nuclei relativ puţin numeroşi, situaţi la periferia citoplasmei şi 2) celule cu „corp străin" („Foreign body cells"), cu nuclei numeroşi, dispersaţi în citoplasmă. După Shevach (1984), monocitele care pătrund într-un focar inflamator pot deveni macrofage rezidente, se pot transforma în celule epitelioide sau fuzionează pentru a deveni celule gigante multinucleate.

Diferenţele morfologice dintre inflamaţia acută şi cea cronică ar putea reflecta diferenţe între funcţiile mediatorilor implicaţi în cele două procese.

Sistemul imunitar al mucoaselor

„Principala funcţie a sistemului imunitar asociat cu mucoasele este de a împiedica pătrunderea numărului enorm de antigene din microorganisme şi alimente, din mediul extern în cel intern."

J. Mestecky

Ţesuturile mucoase furnizează, la majoritatea organismelor superioare, o suprafaţă extinsă, expusă permanent contactului iniţial al unor agenţi patogeni cu gazda lor. Sînt, în mod special, vulnerabile, datorită suprafeţei lor imense, mucoasa digestivă (~ 300 m²) şi cea pulmonară (~ 80 m²), aflate, în mod permanent, în contact cu diferite substanţe străine, virusuri şi microorganisme, asociate cu suprafaţa lor umedă. În consecinţă, în cursul evoluţiei au apărut o serie de mecanisme imunitare, specifice şi nespecifice, care inhibă colonizarea, invazia mucoaselor şi apariţia bolilor.

Existenţa unui sistem imunitar protector local, funcţionînd independent de cel sistemic, a fost propusă iniţial de Besredka (1919). El a demonstrat că iepurii imunizaţi pe cale orală, cu culturi omorîte de *Shigella dysenteriae*, sînt protejaţi de infecţia letală, indiferent de titrul anticorpilor serici. Davies (1922) a sprijinit această concepţie, evidenţiind apariţia coproanticorpilor la bolnavi cu cîteva zile înainte de apariţia în ser. Printre mecanismele imunităţii locale a mucoaselor, un rol esenţial revine anticorpilor „secretori", prezenţi în lichidele care scaldă suprafaţa acestora, deoarece pot interacţiona cu o serie largă de agenţi vii sau neanimaţi. Acest punct de vedere a fost determinat de evidenţierea sIgA în secreţiile externe ale corpului, de către Tomasi Jr. şi Zigelbaum (1963), şi de numeroasele cercetări ce au urmat, care au determinat cadrul conceptual al unui sistem imunitar secretor.

După cum au demonstrat Waldman şi Henney (1971), un factor esenţial al imunităţii locale este calea de introducere a antigenelor : introducerea lor pe cale nazală sau bronhică determină un răspuns imun regional, la nivelul căilor respiratorii, în timp ce introducerea parenterală amorsează o imunitate sistemică. Tipul de răspuns este modulat de o serie de factori accesorii. Utilizarea adjuvanţilor sau a unor agenţi capabili de multiplicare stimulează răspunsul local, chiar după administrare paren-

terală (Waldman şi colab., 1974). În mod similar, o influenţă semnificativă are şi nivelul de aplicare a antigenului. Astfel, administrarea limitată la fosele nazale determină un răspuns exclusiv local, în timp ce administrarea ca aerosoli, în alveolele pulmonare, stimulează şi un răspuns sistemic asociat.

Caracterele sistemului imunitar al mucoaselor

Sistemul imunitar al mucoaselor (SIM) se întrepătrunde cu cel sistemic (SIS). El este însă construit în aşa fel, încît asigură recunoaşterea diferitelor substanţe străine prezente în secreţiile care scaldă mucoasele, declanşează răspunsul imunitar faţă de cele prezente în cantităţi suficiente pentru a-l amorsa şi, apoi, pe calea circuitului sanguin, eliberează celule efectoare, active atît local, cît şi pe alte mucoase, la distanţă, şi anticorpi capabili să respingă microorganisme potenţial invadante.

Următoarele caractere îl deosebesc de cel sistemic:

1) SIM are capacitatea de a supraveghea prezenţa antigenelor străine în afara organismului respectiv, în special în secreţiile intestinale şi bronhice. După datele existente, par să fie preluate eficient numai acele antigene care au tendinţa de a adera de epitelii. Prin contrast, sistemul imunitar sistemic discerne toate macromoleculele străine ce pătrund în lichidele organismului, care, filtrate prin ganglionii limfatici regionali sau prin splină, iniţiază un răspuns imun.

2) Celulele efectoare ale SIM sînt distribuite pretutindeni în lamina propria a mucoaselor, la situsuri îndepărtate de structurile limfoide organizate, în care au loc proliferarea şi diferenţierea precursorilor lor. Răspunsul imun declanşat de infectarea unui situs mucos localizat este urmat de diseminarea celulelor efectoare, în aşa fel încît oferă protecţie unor regiuni încă neinfectate şi chiar unor mucoase îndepărtate. Acest mecanism reduce impactul transmiterii infecţiei în organism de la o mucoasă la alta.

3) Celulele limfocitare şi epiteliale interacţionează pentru a produce molecule de anticorpi, care sînt eliberate, mai mult pe suprafaţa externă a mucoasei, decît în sistemul circulator.

4) Clasa majoră de anticorpi produşi este reprezentată de sIgA, rezistentă la degradarea proteolitică, în contrast cu SIS, care determină formarea predominantă de IgG.

5) În special în cazul sistemului imunitar asociat cu mucoasa digestivă, capacitatea de a dezvolta răspunsul imun local este cuplată cu cea de a inhiba inducţia răspunsului imun sistemic faţă de acelaşi antigen. Această comportare reflectă, probabil, avantajul evolutiv de a preveni, pe cît posibil, imunizarea sistemică faţă de antigenele din alimentaţie, care ajung în circuitul sanguin (Phillips-Quagliata et Lamm, 1987).

Mecanismul răspunsului imun secretor

Tomasi Jr. și Plaut (1985), Brandtzaeg (1985), precum și Mestecky și colab. (1986) sintetizează cunoștințele, uneori contradictorii, referitoare la producerea răspunsului secretor, permițînd stabilirea următorului scenariu de desfășurare.

Inițierea răspunsului imun este determinată de pătrunderea antigenelor ingerate sau inhalate, pe calea celulelor epiteliale specializate ale mucoaselor. În intestinul subțire, spre exemplu, epiteliul asociat cu foliculii limfoizi conține celule M („membranare") subțiri, care transportă antigenul spre interior, prin intermediul unui sistem tubulovezicular. Celule similare, neciliate, care captează antigenele, au fost descrise și în epiteliul bronhic, ca și în epiteliul reticular din criptele amigdaliene și din apendicele uman. Antigenele sînt preluate, prelucrate și „prezentate", într-un mod încă necunoscut, limfocitelor T și B, de către macrofage, celulele dendritice, ca și de unele celule epiteliale și endoteliale, care poartă pe suprafață antigene din clasa II a CMH.

Răspunsul imun depinde de eliberarea de către celulele T_H a unor factori de imunoreglare, care măresc capacitatea de exprimare a IgA, și poate fi influențat suplimentar de intervenția celulelor T_S, care inhibă exprimarea altor izotipuri de către celulele B.

Prin acest mecanism, celulele B primesc „primele semnale" stimulatoare. Procesul are loc în plăcile Peyer și în alte structuri limfoide asociate mucoaselor, ca amigdalele, dar s-ar putea produce și în ganglionii mezenterici sau, după unii autori, în oarecare grad, chiar în unii ganglioni limfatici periferici. În esență însă, răspunsul imun secretor este inițiat de țesuturile limfoide asociate cu mucoasele, denumite obișnuit cu acronimul MALT („Mucosal associated lymphoid tissues"). Au fost studiate, în special, două compartimente ale sale și anume : *sistemul limfoid asociat cu intestinul*, GALT („Gut associated lymphoid system"); și sistemul limfoid asociat cu căile respiratorii, BALT („Bronchus associated lymphoid tract") (fig. 198).

Răspunsul evoluează în următoarele etape :

Migrarea limfocitelor stimulate. „Primele semnale" stimulatoare, reprezentate de antigenele exogene, antrenează migrarea limfocitelor T și B sensibilizate în ganglionii mezenterici (în cazul GALT) și, de aici, pe calea canalului toracic, în circulația sanguină. Migrarea limfocitelor B în afara mucoaselor se însoțește de o creștere a capacității de a sintetiza lanțul J (fig. 199).

Fenomenul de „homing". După ce au circulat prin limfă și sîngele periferic, limfocitele se reîntorc la nivelul mucoaselor („homing").

Ele nu sînt, așa cum s-a crezut anterior, în exclusivitate, celulele blastice care exprimă IgA, ci, cele mai multe, aparțin unor populații de celule cu memorie, în repaus, care au fost probabil expuse „primelor semnale" stimulatoare în plăcile Peyer (Tseng, 1984). Aceste populații sînt foarte heterogene și cuprind limfocite care poartă fie una din clasele de Ig (IgM, IgD, IgA, IgG), fie două izotipuri de Ig în același timp (IgM+IgD) și celule blaste care conțin IgA. Reîntoarcerea lor s-ar face nu numai

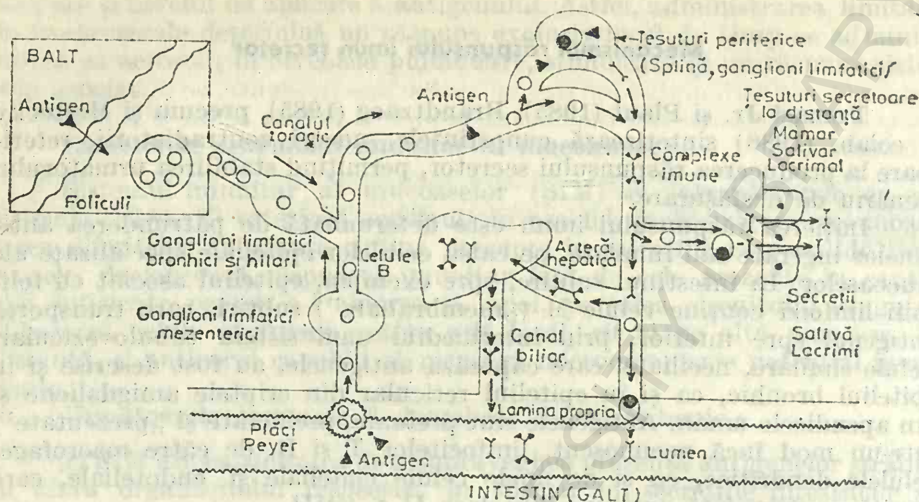


Fig. 198. — Originea anticorpilor secretori după pătrunderea antigenelor pe calea mucoasei digestive (GALT) sau respiratorii (BALT). Figura prezintă interacțiunile dintre constituenții sistemului imunitar al mucoaselor și căile de transport ale IgA dimere și ale complexelor imune în diferite secreții exocrine.

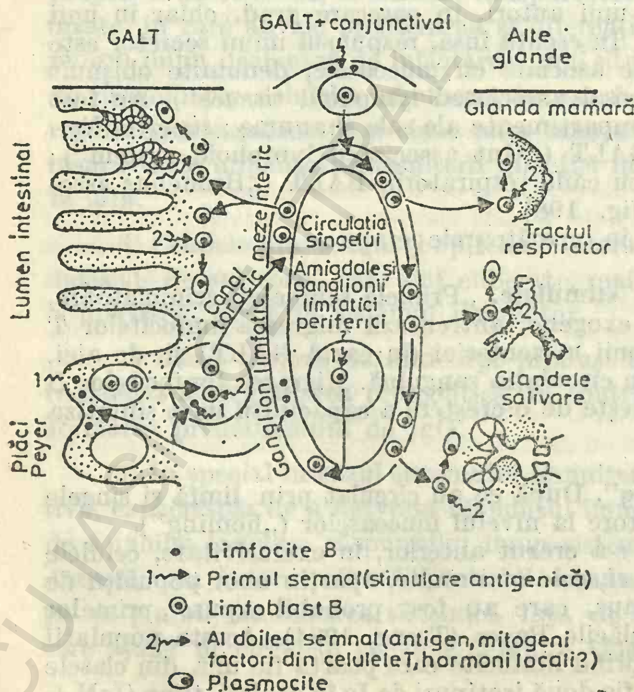


Fig. 199. — Reprezentare schematică a circulației celulelor în sistemul imunitar secretor. Limfocitele B primesc „primele semnale" stimulatoare induse de antigen în plăcile Peyer, alte structuri limfoide asociate cu mucoasele (amigdale), ganglionii limfatici mezenterici și poate, în oarecare măsură, în ganglionii limfatici periferici. Cele mai multe celule B stimulate migrează din plăcile Peyer, prin limfă și prin circulația periferică, în diferite țesuturi secretoare, inclusiv în lamina propria intestinală. Ele pot primi semnale de diferențiere și în ganglionii limfatici și splină. Diferențierea terminală la plasmocite este indusă de „semnale secundare", numai parțial cunoscute, dar în mare măsură dependente de antigen, cel puțin în intestin (după Brandtzaeg, 1985).

la situsul inițial (de plecare), ci, prin „însămînțare", în întreg sistemul limfoid din submucoase. Această diseminare a celulelor T și B sensibilizate la distanță de situsul de pătrundere a antigenului amplifică răspunsul imunitar, prin intrarea în acțiune a întregului sistem de apărare a mucoaselor (Weisz-Carrington și colab., 1975).

Astfel, experiențele pe animale au arătat că precursorii plasmocitelor, care apar în BALT, pot migra în oarecare grad în mucoasa intestinală. De asemenea, foliculii din conjunctiva de iepure sau din amigdalele umane pot contribui la formarea populațiilor de plasmocite din mucoasa gastrointestinală la om. La mai multe specii, celulele cu memorie din GALT sînt diseminate în țesuturi secretorii îndepărtate, ca mucoasele lacrimale, salivare, respiratorii, ca și în glanda mamară în activitate secretorie. Circulația enteromamară a celulelor precursoare IgA ar explica apariția sIgA cu activitate față de bacteriile intestinale în colostru și în laptele de mamă. Aceste date sugerează că amorsarea răspunsului imun secretor al GALT, prin intermediul unor vaccinuri orale, ar fi deosebit de utilă pentru a determina protecția unor teritorii îndepărtate de căile digestive. Ele au determinat pe Bienenstock (1978) să utilizeze denumirea de sistem imunologic comun al mucoaselor („Common mucosal immunological system") (fig. 200). Brandtzaeg (1985) consideră această

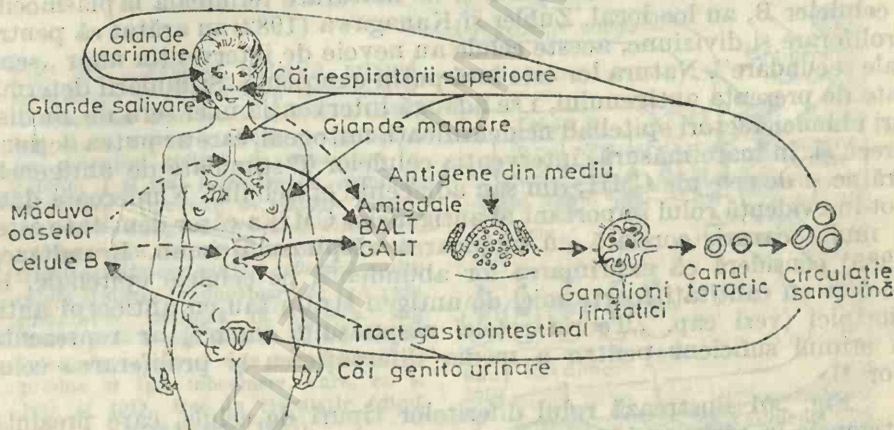


Fig. 200. — Reprezentare schematică ipotetică a sistemului imunitar comun al mucoaselor la om. Celulele limfoide provenite, probabil, din măduva oaselor, intră în plăcile Peyer (GALT) prin venulele cu endoteliu înalt. Sub influența celulelor accesorii și T locale, ele exprimă IgA pe suprafață. Antigenele din mediu pătrund în plăcile Peyer prin pinocitoză și fagocitoză în celulele M și reacționează cu celulele rezidente „accesorii" și cu limfocitele T și B. Celulele B angajate să sintetizeze IgA, sensibilizate de antigene, și limfoblaștii părăsesc plăcile Peyer, trec în ganglionii limfatici, apoi în limfă și în circulație. Final, ele populează diferite glande exocrine și țesuturi asociate cu mucoasele, unde are loc diferențierea terminală la plasmocite care secretă IgA. BALT poate avea un rol asemănător cu GALT. Amigdalele pot fi o sursă de celule precursoare, care populează tractusul aerodigestiv superior (după Mestecky, 1987).

concepție ca o suprasimplificare a mecanismelor complexe care guvernează originea și distribuția precursorilor celulari, cu atît mai evidentă cu cît, pe lîngă diferențele mari în răspunsul diferitelor specii, există și

unele excepţii notabile. Astfel, în unele cazuri, studiul fenomenului de „homing" asupra celulelor din BALT şi GALT a arătat existenţa unei anumite specificităţi de organ. După Pierce şi Cray (1982), ar exista o dihotomie a precursorilor derivaţi din BALT şi GALT în sistemul imun şi chiar în cazul intestinului, datorită căreia localizarea prin „homing" a celulelor producătoare de IgA s-ar face preferenţial în segmentul în care au fost produse. Deşi funcţia majoră a sistemului ar fi cea de diseminare a celulelor B, ar exista şi cazuri în care circulaţia ar fi foarte limitată şi chiar un coeficient de reţinere locală a celulelor B în mucoasa intestinală.

În sfîrşit, trebuie menţionat că, deşi cele mai multe studii arată rolul esenţial al plăcilor Peyer în inducţia răspunsului imun al mucoaselor intestinale, există date privind posibilitatea formării celulelor precursoare pentru producerea IgA în foliculii limfatici solitari, răspîndiţi de-a lungul întregului tract gastrointestinal.

Diferenţierea şi proliferarea celulelor producătoare de IgA. Deşi populaţia de celule provenite din sîngele periferic care colonizează situsurile secretoare este heterogenă, creşterea progresivă a numărului celulelor IgA-pozitive demonstrează că proliferarea şi diferenţierea, inclusiv procesele de „comutare" a izotipului şi de maturare terminală la plasmocite a celulelor B, au loc local. Zubler şi Kanagawa (1982) au arătat că pentru proliferare şi diviziune, aceste celule au nevoie de intervenţia unor „semnale secundare". Natura lor este însă puţin cunoscută. Stimulării determinate de prezenţa antigenului, i se adaugă intervenţia unei serii de mediatori chimici, factori epiteliali neidentificaţi, mitogeni, care ar putea acţiona direct şi, în mare măsură, intervenţia celulelor T stimulate de antigenele străine şi de cele ale CMH, din sau adiacente epiteliului. Numeroase date scot în evidenţă rolul important al antigenelor CMH,a căror densitate este, în multe cazuri, corelată cu amploarea răspunsului imun. Brandtzaeg (1985) consideră că exprimarea lor abundentă pe celulele epiteliale, în asociere cu cantităţi foarte mici de antigen străin sau cu anticorpi antiidiotipici (vezi cap. „Teoria reţelei răspunsului imun") ar reprezenta un stimul suficient pentru a media diferenţierea şi proliferarea celulelor B.

Fig. 201 ilustrează rolul diferitelor tipuri de celule, care prezintă antigenele în reglarea răspunsului imun în ţesuturile limfoepiteliale asociate cu mucoasele sau la situsurile glandulare. Cele mai multe antigene solubile sînt prezentate celulelor T_H, în asociere cu moleculele HLA—DR (clasa II CMH). Intensitatea răspunsului imun secretor depinde de eliberarea de către celulele T_H a unor factori imunoreglatori, care măresc sinteza de sIgA, dar poate fi influenţat şi de stimularea celulelor T_S, care inhibă exprimarea altor izotipuri de către celulele B.

Sinteza sIgA. În cursul etapelor finale ale diferenţierii, majoritatea celulelor B mature evoluează spre stadiul de plasmocite producătoare de IgA, dotate cu un potenţial înalt de exprimare a lanţului J. Ele provin din „comutarea" („switching") izotipului limfocitelor B din populaţie (fig. 202).

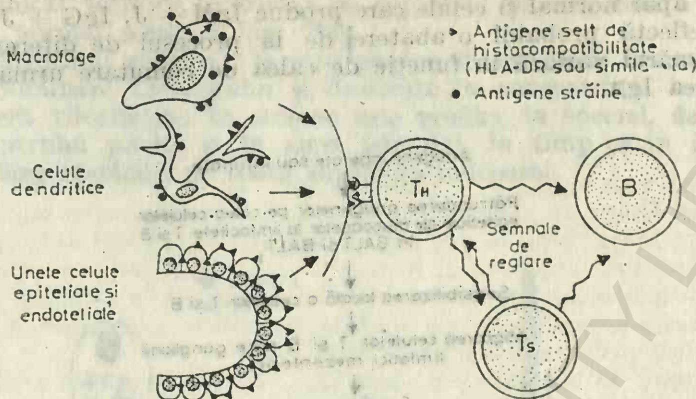


Fig. 201. — Reprezentare schematică a rolului celulelor care prezintă antigenul, în fenomenele de reglare imunitară, la nivelul situsurilor glandulare sau în țesuturile limfoepiteliale asociate cu mucoasele. Cele mai multe antigene solubile sînt prezentate celulelor T_H, în asociere cu moleculele HLA-DR (clasa II) CMH. Răspunsul în anticorpii de tip sIgA depinde de eliberarea din celulele T_H activate a unor factori imunoreglatori, care măresc exprimarea IgA sau care stimulează celulele T_S, ca să inhibe exprimarea altor izotipuri de către celulele B (după Brandtzaeg, 1985).

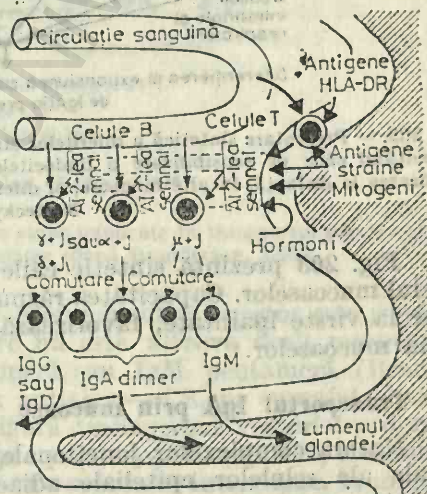


Fig. 202. — Schemă ipotetică privind menținerea și diferențierea terminală a imunocitelor la situsurile secretorii. Celulele B cu memorie circulante prezintă un potențial ridicat de exprimare a catenei J și sînt receptive la „semnale secundare" (mediate de celulele T stimulate de antigene străine și HLA-DR, mitogeni sau hormoni). În cursul proliferării și diferențierii lor, cele mai multe celule B devin producătoare de IgA prin comutarea izotipică ($\mu \rightarrow \gamma \rightarrow \alpha$ sau direct $\mu \rightarrow \alpha$ sau $\delta \rightarrow \alpha$). Cînd cantitatea de catene J este insuficientă se produc și IgA monomere, care, ca și IgG și IgD, trec în circulație (după Brandtzaeg, 1985).

Acest proces s-ar putea realiza, după Cebra și colab. (1982), precum și după Brandtzaeg (1985), pe mai multe căi :

1) vectorial : IgM → IgG → IgA ;

2) direct : IgM → IgA, sub acțiunea unor celule T_H ;

3) direct : IgD → IgA, mai ales în tractul aeroalimentar superior, în care celulele care produc IgD sînt relativ frecvente și, adesea, predominante (50—80%), mai ales în cursul deficiențelor în IgA.

Paralel cu plasmocitele care produc IgA, în diferitele țesuturi secretoare, apar normal și celule care produc IgM + J, IgG + J și IgD + J. Ele reflectă probabil o abatere de la procesul de diferențiere clonală. Numărul variază în funcție de calea de comutare urmată pentru exprimarea IgA.

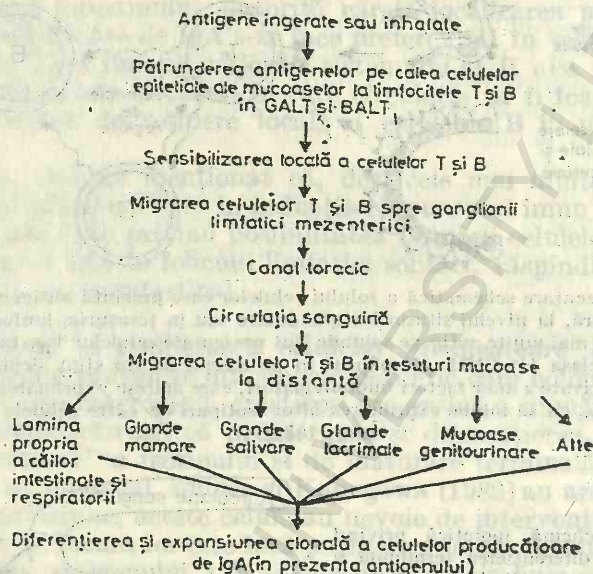


Fig. 203. — Prezentare sintetică a diferitelor etape ale răspunsului imun la nivelul mucoaselor, evidențiind căile de sensibilizare a limfocitelor T și B, migrarea lor din GALT și BALT, localizarea la distanță, în alte mucoase, și diferențierea la plasmocite care produc IgA (după Mestecky, 1980).

Fig. 203 prezintă sintetic căile de realizare a răspunsului imun la nivelul mucoaselor. Capacitatea răspunsului imun secretor de a fi eficient, chiar la vîrste înaintate, favorizează programele de vaccinare prin protecția mucoaselor.

Transportul IgA prin mucoase

Natura complexelor joncționale și legătura strînsă dintre regiunile apicale ale celulelor epiteliale adiacente împiedică trecerea directă a IgA prin spațiul intercelular în lumen și fac necesar transportul transcelular. Pentru a explica mecanismul acestui transport au fost elaborate mai multe modele, cu diferențe minime. Toate au în comun trecerea IgA dimere, prin celulele epiteliale, asociate cu legarea componentului secretor (CS), și eliberarea lor în regiunea apicală a acestora sub formă de $[IgA]_2 \bullet J \bullet CS$. După Nagaka, Nakane și Brown (1975), moleculele de IgA polimere, care conțin catena J, $[IgA]_2 \bullet J$, fie produse de plasmocitele subepiteliale, fie derivate din circulația sanguină, difuzează prini nterstițiile laminei propria și traversează membrana bazală. Transportul lor este facilitat de prezența componentului secretor CS, factorul-cheie al siste-

mului imunitar secretor, exprimat pe suprafaţa bazolaterală a celulelor epiteliului normal secretor (fig. 204).

În intestinul subţire, CS este produs în cantitate mare de către celulele columnare Lieberkühn şi descreşte în concentraţie în epiteliul care acoperă vilozităţile. În stomac este produs, în special, de celulele regiunii antrului piloric şi în zona istmului, în timp ce în intestinul gros este larg răspîndit pe toată suprafaţa mucoasei.

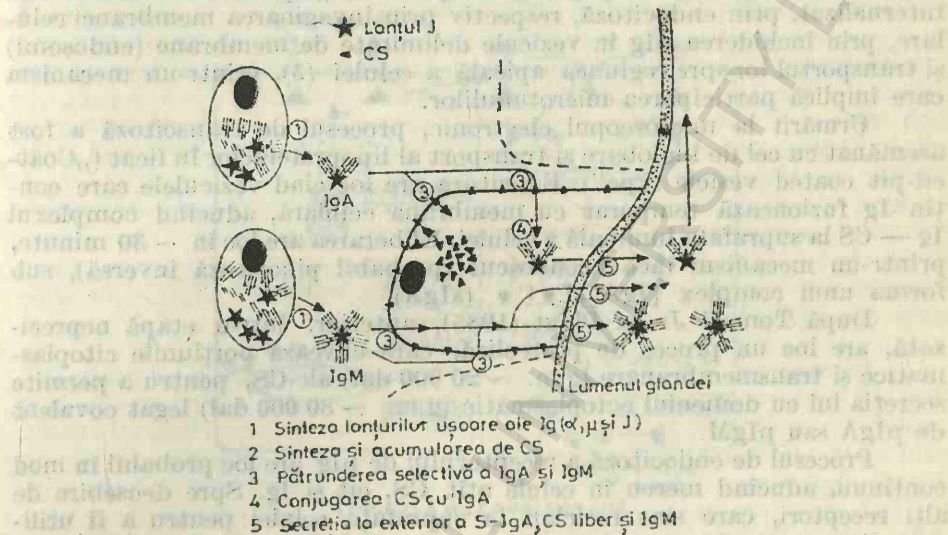


Fig. 204. — Reprezentare schematică a diferitelor etape implicate în transportul selectiv glandular al IgA dimere şi IgM pentamere (după Brandtzaeg, 1985).

Rolul receptorului de Ig polimere. Componentul secretor este produs ca un precursor transmembranar, care nu este altceva decît receptorul specific pentru regiunea Fc a IgA dimeră sau IgM pentameră (Brandtzaeg, 1981). Se formează un complex anticorp — CS, pe suprafaţa bazolaterală a celulelor epiteliale. Ele asigură transportul vectorial ordonat al imunoglobulinelor polimere (pIg) spre partea opusă (apicală) a celulei, unde este eliberat în secreţiile externe (ale mucoasei intestinale, bronhice, în lapte, bilă etc.), pentru a forma o primă barieră de apărare imunologică.

La om, componentul secretor este o proteină transmembranară, formată din 773 de aminoacizi (AA), care includ următoarele secvenţe funcţionale: 1) segmentul de peptid „semnal" (18 AA), la capătul N terminal; 2) segmentul ectoplasmatic (629 AA); 3) segmentul transmembranar (22 AA, nr. 630—652) şi 4) „coada" citoplasmatică (103 AA). Segmentul extracelular are 5 domenii omologe repetate, fiecare avînd 100—115 AA. Fiecare domeniu conţine două molecule de cisteină, separate de 60—70 AA. Cele 5 domenii repetate seamănă, ca omologie, foarte mult cu regiunile variabile (V) ale catenelor K ale Ig. Această

asemănare sugerează că receptorul de pIg a evoluat probabil de la o Ig, care a avut o regiune variabilă cu specificitate pentru un situs localizat pe pIg. Ca urmare, interacţiunile dintre domeniile receptorului pIg cu domeniile pIg ar putea fi asemănătoare cu interacţiunile dintre domeniile pIg înşile. Alternativ, receptorul ar putea avea o specificitate similară regiunii V a anticorpilor, reacţionînd cu un situs de pe pIgA sau pIgM.

Mostov (1986) propune un model general de transport prin celule, după care CS sintetizat în reticulul endoplasmatic (1) este transportat prin complexul Golgi, în care este glicozilat (2) la suprafaţa bazolaterală a celulei (3). După legarea pIg (4), complexul $[IgA_2] \bullet J \bullet CS$ format este internalizat, prin endocitoză, respectiv prin invaginarea membranei celulare, prin închiderea pIg în vezicule delimitate de membrane (endosomi) şi transportul lor spre regiunea apicală a celulei (5), printr-un mecanism care implică participarea microtubulilor.

Urmărit la microscopul electronic, procesul de transcitoză a fost asemănat cu cel de înglobare şi transport al lipoproteinelor în ficat („Coated-pit coated vesicle type"). Exocitoza are loc cînd veziculele care conţin Ig fuzionează temporar cu membrana celulară, aducînd complexul Ig — CS la suprafaţa luminală a celulei. Eliberarea are loc în ~ 30 minute, printr-un mecanism încă necunoscut (probabil pinocitoză inversă), sub forma unui complex $[IgA_2]J \bullet C \bullet$ (sIgA).

După Tomasi Jr. şi Plaut (1985), anterior, într-o etapă neprecizată, are loc un proces de proteoliză, care clivează porţiunile citoplasmatice şi transmembranare (g.m. ~ 20 000 dal) ale CS, pentru a permite secreţia lui cu domeniul ectoplasmatic (g.m. ~ 80 000 dal) legat covalent de pIgA sau pIgM.

Procesul de endocitoză a receptorului de pIg are loc probabil în mod continuu, aducînd mereu în celule atît CS, cît şi Ig. Spre deosebire de alţi receptori, care sînt reciclaţi la suprafaţa celulei pentru a fi utilizaţi din nou, componentul secretor este modificat prin clivare proteolitică, dar nu este distrus. El rămîne asociat cu ligandul său, astfel că nu poate fi refolosit în translocări ulterioare. De aceea, este numit „receptor de sacrificiu" („Sacrificial receptor") (Crago şi Tomasi, 1987). Fig. 205 prezintă sintetic evoluţia procesului de transport pentru pIgA şi pIgM.

Locul de formare a sIgA

Numeroşi cercetători au scos în evidenţă rolul primordial al ţesutului limfoid din submucoase în sinteza sIgA. Cu excepţia posibilă a veziculei biliare, cea mai mare parte din sIgA este produsă local, fapt demonstrat de prezenţa unei mari cantităţi de plasmocite şi de precursori imediaţi ai lor, capabili să sintetizeze IgA în mucoasa nazală, glandele submandibulare, parotide, mamare, lacrimale, ca şi în mucoasele antrumului gastric, duodenului, jejunului şi intestinului gros.

Astfel, intestinul adult conţine $\sim 10^{10}$ celule de acest tip/metru, ceea ce reprezintă o populaţie celulară importantă, comparativ cu numărul total al celulelor care produc Ig în măduva oaselor, splină şi ganglionii limfatici (în total $\sim 2{,}5 \times 10^{10}$, după Turesson, 1976). În sprijinul acestui punct de vedere se citează şi faptul că imunizarea orală a şoarecilor cu feritină extrasă din splina de cal induce sinteza de IgA, produsă

probabil în special în intestin, în timp ce imunizarea parenterală produce IgM și IgG, formate în splină și ganglioni. Tomasi Jr. și Plaut (1985) scot, de asemenea, în evidență rolul esențial al mucoaselor și în special al celor intestinale, care conțin mai mult țesut limfoid decît splina și ganglionii limfatici.

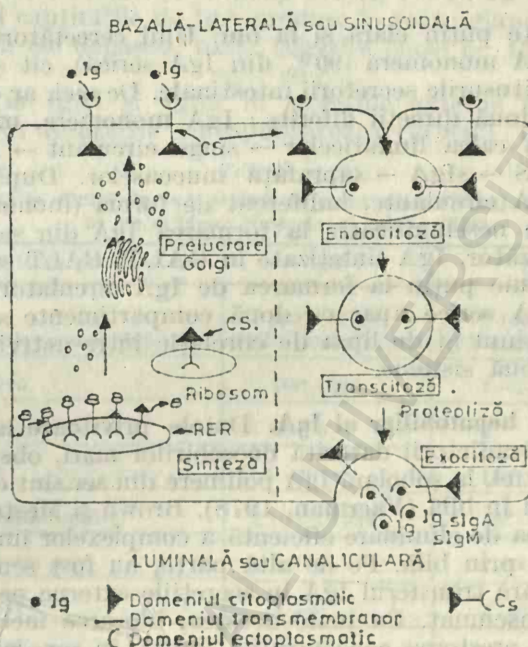


Fig. 205. — Model de transport al IgA și IgM prin celulele epiteliale ale mucoaselor sau prin hepatocite. Sînt prezentate: 1) sinteza și prelucrarea componentului secretor; 2) funcția sa de receptor pe fața bazolaterală a plasmalemei celulelor epiteliale ale mucoaselor sau pe membrana sinusoidală a hepatocitului; 3) endocitoza receptorilor și transcitoza în endosomi; 4) exocitoza la suprafața luminală sau canaliculară (după Tomasi și Plaut, 1985).

Componenții-cheie ai țesutului limfoid intestinal — GALT — sînt acumulările de celule limfoide răspîndite în tot intestinul subțire, cele mai evidente fiind cele din plăcile Peyer, care apar în viața fetală. Foliculii limfoizi din submucoase conțin celule B, T_H, T_C, plasmocite, macrofage și celule dendritice. Ele reprezintă zone timodependente (~20% celule T) și bursodependente (50—80% celule B, dintre care ~40% poartă pe suprafață IgA și ~40% IgM). În timp ce în splină și în ganglioni raportul celulelor care produc IgA/IgG este de 1/5, în lamina propria intestinală este de 20—30/1. Owen (1979) a demonstrat că cele mai multe antigene ingerate sînt absorbite prin epiteliul specializat care acoperă zonele cu plăci Peyer și că, în general, foliculii din submucoase sînt acoperiți de un epiteliu plat, ce lasă să treacă ușor antigenele.

Foliculi limfoizi similari se găsesc și în mucoasele respiratorii, care formează sistemul BALT. În concluzie, se poate spune că majoritatea sIgA sînt sintetizate în mucoase și că în cazul sIgA salivar, spre exemplu, numai maximum 2% provin din plasmă (Delacroix și colab., 1982).

După Tomasi Jr. (1984), la unele specii, țesutul limfoid secretor (în special din GALT) ar fi sursa majoră chiar și pentru IgA serică. În schimb, Virella și colab. (1978) consideră că IgA polimere pot fi produse și în măduva oaselor, splină și unii ganglioni limfatici, de unde pot ajunge în secreții, după ce au fost preluate de celulele epiteliale care produc CS. Aceste date contradictorii sînt datorite în mare parte experimentelor pe specii animale diferite.

Situația este puțin clară și la om. Unii cercetători consideră că, probabil, atît IgA monomeră (90% din IgA serică), cît și cea polimeră ar fi produse în situsurile secretorii intestinale. De aici, ar difuza sau ar fi transportate în două direcții diferite : IgA monomere, mai mici și mai difuzibile, ar lua calea limfaticelor → sînge circulant → IgA serice, iar IgA dimere → CS → sIgA → suprafața mucoaselor. După Mestecky și colab. (1986), IgA circulante, indiferent de formă (monomeră sau polimeră), contribuie nesemnificativ la formarea IgA din secreții (~ 2%). În mod corespunzător, IgA sintetizate în GALT, BALT sau alte glande secretorii contribuie puțin la formarea de IgA circulatorie. Deci, sistemele sIgA și IgA serice apar ca două compartimente separate. Acest concept este susținut și de lipsa de corelație între activitățile de anticorp ale celor două sisteme.

Transportul hepatobiliar al IgA. Datele privitoare la originea IgA din bilă sînt contradictorii datorită deosebirilor mari, observate de la o specie la alta. Astfel, la șobolan, IgA polimere din ser sînt eliminate rapid prin ficat, trecînd în bilă (Vaerman, 1978). Brown și Mestecky (1983) au descris capacitatea de eliminare eficientă a complexelor imune, care conțin IgA polimere prin bilă. Pe de altă parte, au fost semnalate numeroase cazuri în care transferul IgA în secrețiile externe pe calea ficat → bilă este puțin însemnat. Cu toate acestea, blocarea mecanică a căilor biliare determină creșterea concentrației $[IgA]_2$ în ser, iar îndepărtarea obstacolului, revenirea la normal. La unele specii, transferul IgA din ser mărește cantitatea de sIgA din lumenul intestinal. El este condiționat de prezența CS legat de membrană pe suprafața sinusoidală a hepatocitului (fig. 205), care asigură endocitoza, transcitoza și secreția Ig. Mecanismul este foarte eficient la rozătoare și, după Vaerman și Delacroix (1984), nesemnificativ la om, deoarece hepatocitele umane nu sintetizează sau nu exprimă pe suprafața lor în cantități detectabile CS, receptorul specific pentru IgA polimer.

După Kutteh și colab. (1982), bolnavii prevăzuți cu tuburi colectoare, amplasate în canalul biliar, elimină prin bilă între 160 și 400 mg IgA/24 de ore, în proporție de 10 : 1 pentru $[IgA]_2$ față de IgA monomeră, dar ligatura sau obstrucția canalului biliar nu ridică nivelul IgA din ser. Cu toate acestea, cei mai mulți cercetători înclină spre ideea că IgA din bilă ar putea proveni din ser. Eliminarea lor s-ar realiza printr-un mecanism încă necunoscut, care nu exclude participarea unor receptori diferiți de CS pe suprafața hepatocitelor. Există însă și posibilitatea producerii lor de către plasmocite specializate situate în mucoasa veziculei sau a canalelor biliare.

Producția zilnică și distribuția subclaselor de IgA. Heremans (1974) apreciază producția zilnică de IgA monomeră (serică) la 18,5—30 mg/kg, deci aproximativ cît cea de IgG (30 mg /kg/zi). După Mestecky și colab. (1986), la om se produc cantități mari de IgA monomere în măduva oaselor, dar catabolismul relativ rapid, comparativ cu cel al IgG, face ca nivelul IgA să fie foarte scăzut. Cantitatea de IgA produsă de GALT depășește pe cea sistemică (Jonard și colab., 1984). În felul acesta, dacă se iau în calcul cantitățile de IgA produse în toate glandele cu secreție, la adultul normal, ele depășesc toate celelalte clase de Ig la un loc (tabelul nr. 53).

Distribuția IgA1 și IgA2 în secrețiile externe reflectă proporția plasmocitelor în țesuturile corespunzătoare (tabelul nr. 54).

Tabelul nr. 53

Producția zilnică de IgA și IgG la omul adult (70 kg), exprimată în mg/zi (după Mestecky și colab., 1986)

Cantitatea prezentă în :	IgA	IgG
Circulația sanguină	1 295 – 2 100 (18,5 – 30 mg/kg/zi)	2 100 (30 mg/kg/zi)
Salivă	100–200	1–2*
Lacrimi	1,25–5,5	?
Bilă	54–400**	160
Intestin subțire	2 100–5 234	587**
Intestin gros	1 170*	137**
Urină	1–3	1–3
Nazofaringe	45	15
Col uterin	?	?
Total	3 598–9 158	2 998

* Probabil subestimată.
** Nu numai din producție locală

Tabelul nr. 54

Distribuția IgA1 și IgA2 (%) (după Mestecky și colab., 1986)

Lichidele corpului	IgA1	IgA2	Țesuturi	IgA1*	IgA2*
Secreții externe (salivă, lacrimi, lapte, intestinale, bronhice etc.)	50–67	33–50	Țesuturi secretoare (glande salivare, lacrimale, intestin)	39–56	44–61
Ser	79–93	7–21	Măduva oaselor, splină	79–88	8–12

* Procentul celulelor IgA1- sau IgA2-pozitive

Datele sînt confirmate şi de Crago (1984), care, studiind biosinteza diferenţială a celor două subclase de IgA, a demonstrat că celulele din mucoasele intestinale şi ale glandelor salivare şi lacrimale le produc în cantităţi aproximativ egale. În schimb, celulele din ţesutul splenic, amigdalian, măduva oaselor şi ganglionii limfatici conţin predominant (75—90%) plasmocite care produc IgA1.

Funcţiile sIgA

Deşi modul de acţiune al sIgA este încă incomplet lămurit, numeroase fapte de observaţie pledează pentru a le considera ca parte esenţială a mecanismelor de apărare a mucoaselor împotriva infecţiilor locale. Prezenţa constantă a sIgA cu activitate dirijată faţă de microorganismele ce populează normal mucoasele, ca şi corelaţia directă dintre concentraţia sIgA în secreţii şi rezistenţa mucoaselor faţă de infecţii sînt numai o parte din argumentele în favoarea acestei concepţii.

Heremans şi Vaerman (1971) au emis, cei dintîi, ideea că sIgA este perfect adaptată pentru a împiedica pătrunderea antigenelor în mucoase. Fundenberg (1974), reluînd această idee, consideră că, spre deosebire de IgG şi IgM2, rolul sIgA nu este de a recunoaşte microorganismele străine sau de a inhiba multiplicarea lor, ci, mai degrabă, de a preveni accesul lor la sistemul imunitar. Într-o gazdă imunologic virgină, sIgA împiedică producerea „păcatului antigenic originar", acţionînd ca o „centură de castitate imunologică" („Immunological chastity belt"). Stokes şi Turner (1975) numesc acest fenomen excludere imună („Immunoexclusion").

Influenţa sIgA asupra colonizării bacteriilor pe suprafaţa mucoaselor. În multe cazuri, infectarea mucoaselor este condiţionată de aderenţa prealabilă a bacteriilor de epitelii, prin intermediul antigenelor lor de suprafaţă. Secreţiile mucoaselor, activitatea cililor, mobilitatea peristaltică, descuamarea epiteliilor, fluxul lichidelor etc. acţionează frecvent insuficient pentru a le îndepărta. sIgA măreşte aceste efecte, legîndu-se de glicoproteinele suprafeţei bacteriilor, diminuînd aderenţa acestora şi împiedicînd colonizarea mucoaselor, infecţia locală şi transportul antigenelor de la un compartiment al corpului la altul.

Williams şi Gibbons (1972) au studiat efectul inhibitor al sIgA asupra aderenţei bacteriei *Streptococcus salivarius* la celulele epiteliale bucale umane: în prezenţa a 65 μg sIgA, aderenţa bacteriilor scade la 24% faţă de martor. Lichidul parotidian o scade la 56%, în timp ce neutralizarea sIgA cu anticorpi anti-sIgA restabileşte practic (98%) relativa incapacitate de aderenţă iniţială. În cazul acestei bacterii, implicată în patogenia cariei, sIgA, pe lîngă blocarea structurilor de suprafaţă, inhibă sinteza polizaharidului dextranic de către enzima glicozil-transferaza (dextran-sucraza) (Aly şi colab., 1977), necesar pentru aderenţă.

În tubul digestiv, sIgA împiedică legarea bacteriei *Vibrio cholerae* şi a enterotoxinei sale, protejînd organismul atît faţă de infecţie, cît şi faţă de intoxicaţia holerică. Imunizarea orală cu *V. cholerae* induce producerea de coproanticorpi, care diminuă mult aderenţa bacteriei *in vivo* de pereţii intestinali. Acelaşi fenomen a fost descris pentru *E. coli* (în

intestin şi în căile urinare), pentru gonococ (în celulele vaginale şi colul uterin), ca şi pentru streptococ (în celulele bucale). Prezenţa segmentului Fc intact, încărcat electronegativ, pare să joace un rol important în inhibarea aderenţei antigenelor acoperite de anticorpi pe celulele epiteliale.

Funcţiile dependente de sistemul complement ale sIgA sînt foarte limitate la suprafaţa mucoaselor. Acesta poate avea un rol de amplificare a efectelor sIgA (deşi se găseşte în cantităţi mici la acest nivel), dacă nu este inactivat de diferite substanţe. De asemenea, rolul funcţiei opsonizante a sIgA este relativ neînsemnat în raport cu procesele care se desfăşoară la nivel tisular, datorită numărului mic de fagocite şi funcţiei lor alterate la nivelul mucoaselor. Activînd într-un mediu care conţine numeroşi factori ai apărării naturale (ca lizozim, lactoferină, sistemul lactoperoxidazei etc.) şi diferite sisteme biologice nespecifice de amplificare a rezistenţei (permeabilitate vasculară crescută, chemiotaxie, citotoxicitate, mastocite, fagocitoză, complement etc.), sIgA interacţionează benefic cu acestea, pentru a realiza funcţia biologică esenţială de eliminare imună („Immune elimination") (fig. 206).

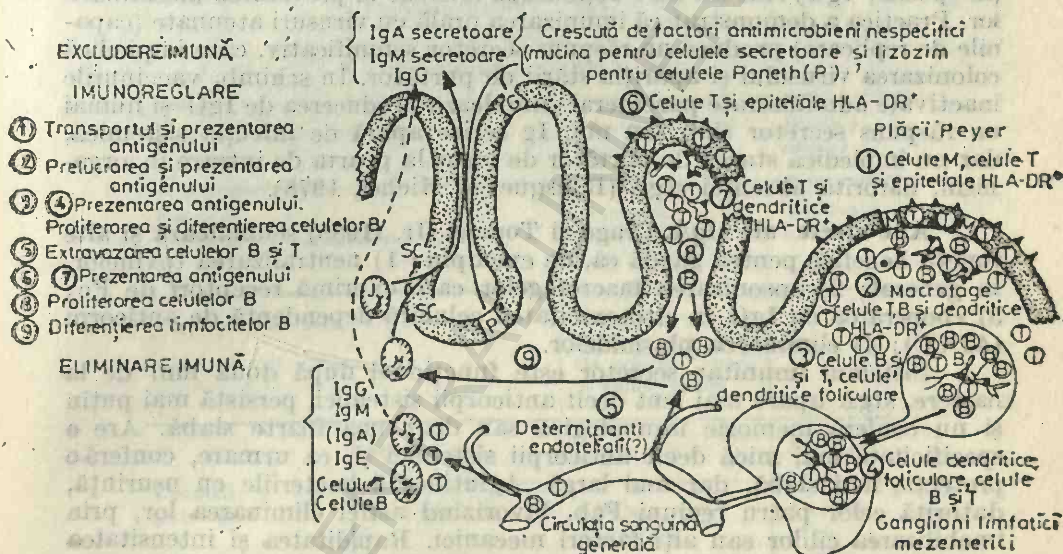


Fig. 206. — Reprezentare schematică a principalilor componenţi ai sistemului de apărare a mucoaselor: imunoexcluderea, imunoreglarea şi imunoeliminarea. Stimularea antigenică a ţesutului limfoid asociat cu mucoasele furnizează „primul semnal" celulelor B, care migrează în regiunile glandulare ale mucoasei pe calea limfei şi a sîngelui periferic. „Semnalele secundare" induc proliferarea locală şi diferenţierea terminală a celulelor B extravazate. IgM este transportată activ de celulele criptelor, în timp ce IgG ajunge în lumen prin difuzie pasivă (săgeata subţire întreruptă) (după Brandtzaeg, 1985).

Cu toate acestea, spre deosebire de IgM, IgG şi IgE, ca izotip de anticorp, IgA nu utilizează căile inflamatorii de eliminare a antigenelor. Acest mod de acţiune este avantajos nu numai pentru eliminarea antigenelor exogene, ci şi pentru interacţiunea cu cele endogene. Din acest punct de vedere, sIgA şi IgA serică se deosebesc de celelalte izotipuri de antigene.

Inhibarea absorbţiei antigenelor macromoleculare. Adulţii multor specii absorb sau inhalează cantităţi mari de antigene solubile macromoleculare prin celulele epiteliale ale mucoaselor. Walker şi Bloch (1972, 1983) au demonstrat că sIgA leagă antigenele nocive, formînd cu ele complexe imune neabsorbabile, care apoi sînt degradate la suprafaţa mucoaselor de enzimele proteolitice. După imunizarea orală cu unele antigene proteice, spre exemplu, absorbţia lor la nivelul ileonului şi jejunului scade la ~33% şi respectiv la 38%, faţă de martor. Se realizează astfel un mecanism important de împiedicare a pătrunderii unor antigene dăunătoare în organism, numit excludere imună ("Immune exclusion") (fig. 206).

Activitatea antivirală. sIgA conferă cea mai mare parte din rezistenţa faţă de virusurile respiratorii (*Rhino-*, *Myxo-*, *Paramyxo-*, *Coronavirus*, virusul respirator sinciţial etc.), care rămîn localizate la suprafaţa mucoaselor. În cazul virusurilor care evoluează cu o fază sistemică după ce s-a produs infecţia locală (poliovirus, rujeolă etc.), anticorpii circulanţi (în special, IgG) sînt cei care acţionează eficient în prevenirea diseminării lor. Practica a demonstrat că imunizarea orală cu virusuri atenuate (capabile de replicare) produce un răspuns secretor semnificativ, care împiedică colonizarea virusului şi apariţia stării de purtător. În schimb, vaccinurile inactivate administrate parenteral stimulează producerea de IgG şi numai un răspuns secretor slab sau nul. Ig serice apără de infecţia sistemică, dar nu împiedică starea de purtător de virus la poarta de intrare în organism, datorită absenţei sIgA (Bousquet şi Michel, 1978).

Alte efecte ale sIgA. Crago şi Tomasi Jr. (1985) semnalează şi alte funcţii benefice pentru gazdă ca, de exemplu: 1) neutralizarea toxinelor, în general; 2) opsonizarea macrofagelor care exprimă receptori de Fc; 3) cooperarea cu IgG în citotoxicitatea celulară dependentă de anticorpi (ADCC); 4) eliminarea plasmidelor.

Sistemul imunitar secretor este funcţional după două luni de la naştere. sIgA apare mai lent decît anticorpii sistemici, persistă mai puţin şi nu conferă memorie imunologică sau doar una foarte slabă. Are o specificitate mai mică decît anticorpii sistemici şi, ca urmare, conferă o protecţie mai slabă, dar mai largă. Aglutinează bacteriile cu uşurinţă, datorită celor patru regiuni Fab, favorizînd astfel eliminarea lor, prin imobilizarea cililor sau alţi factori mecanici. Rapiditatea şi intensitatea protecţiei conferite sînt corelate cu concentraţia sIgA în secreţii.

Apariţia IgA în evoluţie. Contrar datelor iniţiale, care considerau că IgA au apărut iniţial la păsări, Hedge şi Ambrosius (1984) au demonstrat prezenţa lor la amfibieni. Diversificarea, sub raportul formelor moleculare, a distribuţiei în lichidele corpului, a situsurilor de producere şi a funcţiilor efectoare, a continuat pînă la om, la care, după datele cele mai noi, IgA apare ca izotipul de Ig produs în cele mai mari cantităţi. Deşi atît secreţiile externe, cît şi serul sanguin conţin molecule aparţinînd aceluiaşi izotip de IgA, sistemul secretor şi cel seric diferă foarte mult sub raportul proprietăţilor IgA produse, al originii şi specificităţii activităţii lor ca anticorpi, în aşa fel încît pot fi considerate ca sisteme cu un grad foarte mare de independenţă (tabelul nr. 55).

Tabelul nr. 55

Independența sistemelor IgA secretoare și serice (după Mestecky și colab., 1986)

		IgA secretoare	IgA serică
Forma moleculară		Polimeră	Monomeră
Subclasele		IgA1 ⩾ IgA2	IgA1 > IgA2
Activitatea de anticorp	Antigene proteice	IgA1 > IgA2	Aproape exclusiv IgA1
	Antigene glucidice	IgA1 > IgA2	—
	Lipopolizaharide	IgA2 > IgA1	—
	Acid lipoteichoic	IgA2 > IgA1	—
Locul de producere		Țesuturile secretoare	Măduva oaselor
Originea precursorilor plasmocitelor IgA		Țesuturile limfoide GALT și BALT	Măduva oaselor
Funcțiile efectoare		Interacțiune cu celulele epiteliale de origine ecto- și endodermică	
Condiții patologice	Mielom IgA	Neafectate	Afectate
	Deficiență IgA	Afectate sau neafectate	Afectate
Iradierea cu Cs a singelui periferic		Afectate	Neafectate

Proteazele IgA1

sIgA prezentă în diferitele secreții externe este expusă la acțiunea atît a enzimelor proteolitice din tractul gastrointestinal, cît și a celor produse de diferite bacterii. Unele bacterii patogene ca : *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Str. sanguis* (implicat în patogenia cariei), *Haemophilus influenzae* sau *Bacteroides melaninogenicus* (boli periodontale) produc o serie de enzime extracelulare, dependente de Mg^{2+}, care clivează numai IgA1 umană (Mueller, 1971). Ele

au o înaltă specificitate de substrat, care ar putea depinde de combinarea cu o dextransucrază și acționează prin clivarea unei singure legături peptidice din regiunea „balama" a lanțului α1, în pozițiile 227—228 (Pro—Thr) la *Str. pneumoniae* și *Str. sanguis* în pozițiile 231—232 (Pro—Ser) la *H. influenzae* și în pozițiile 235—236 (Pro—Thr) la *N. gonorrhoeae*. După clivare, IgA1 pierde capacitatea de a aglutina bacteriile respective. În prezent nu se știe precis dacă prezența proteazelor IgA1 ajută bacteriile care infectează normal suprafețele mucoase ale căilor respiratorii superioare să scape de efectul protector al IgA și să producă infecții. Existența lor aproape exclusiv la bacterii care produc infecții umane, prezența în secrețiile infectate și specificitatea de substrat pentru IgA1 permit ipoteza unei participări în patogenia procesului infecțios, ca un factor de virulență ce favorizează invazia gazdei.

În acest sens, proteazelor IgA1 le-au fost atribuite o serie de funcții ca: 1) interferența cu adeziunea antigenelor particulate de mucoase și eliminarea lor consecutivă; 2) scăderea sau suprimarea capacității de legare a antigenelor de fragmentele Fab; 3) interferența cu o serie de funcții mediate de Fc (reacții bactericide în ser, suprimarea chemotaxiei, împiedicarea legării IgA de celulele T; 4) modularea posibilă a răspunsului imun (Mestecky și colab., 1980). Datorită rezistenței sale la acțiunea acestor enzime, IgA2 poate fi considerată ca o variantă a IgA1, rezistentă la proteazele IgA1, obținută prin deleția a 13 aminoacizi din regiunea „balama", care includ legătura clivată în mod specific (Tomasi Jr. și Plaut, 1985).

Prezența altor clase de Ig în secreții. Pe lîngă sIgA, diferitele secreții conțin și imunoglobuline aparținînd altor clase (fig. 207), în concentrații mai mari decît s-ar putea explica prin simpla transsudare din ser. Aceasta sugerează posibilitatea formării lor locale de către plasmocite situate în submucoasă, mai ales în cursul proceselor inflamatorii determinate de infecții localizate.

În acest sens pledează datele lui Brandtzaeg (1985), referitoare la distribuția procentuală a plasmocitelor producătoare de IgA, IgM, IgG și IgD în diferite țesuturi secretorii umane (fig. 208) și la densitatea acestora pe mm^2 de mucoasă (fig. 209).

Aceste date arată că plasmocitele producătoare de IgM formează o fracțiune importantă a populației celulare, mai ales în mucoasa duodenală și în jejun. Cele producătoare de IgG reprezintă, în medie, ~3—5% în mucoasa normală, predominînd în mucoasa gastrică și nazală. Plasmocitele producătoare de IgD sînt întîlnite, în special, în tractul aeroalimentar superior, care include mucoasa nazală, glandele salivare și lacrimale, în timp ce IgE este întîlnită doar ocazional în mucoasa gastrointestinală.

În ansamblu, apărarea mucoaselor este rezultatul intervenției unor mecanisme complexe, umorale și celulare, specifice și nespecifice, care acționează sinergic pentru a asigura protecția acestei bariere naturale, aflată în contact permanent cu exteriorul și expusă agresiunilor antigenice determinate de virusuri, de microorganisme sau de substanțe chimice naturale ori de sinteză (fig. 210).

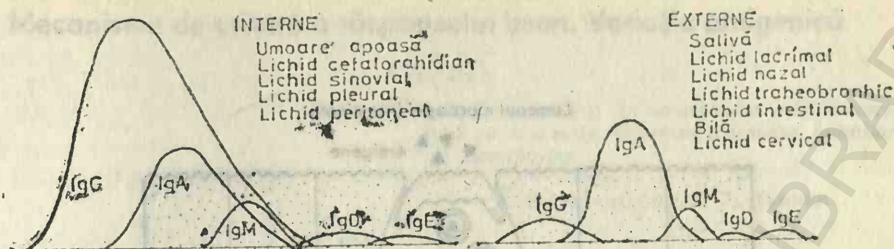


Fig. 207. — Caracterizarea principalelor secreţii ale organismului uman, în funcţie de cantitatea diferitelor clase de imunoglobuline (după Tomasi Jr., 1984)

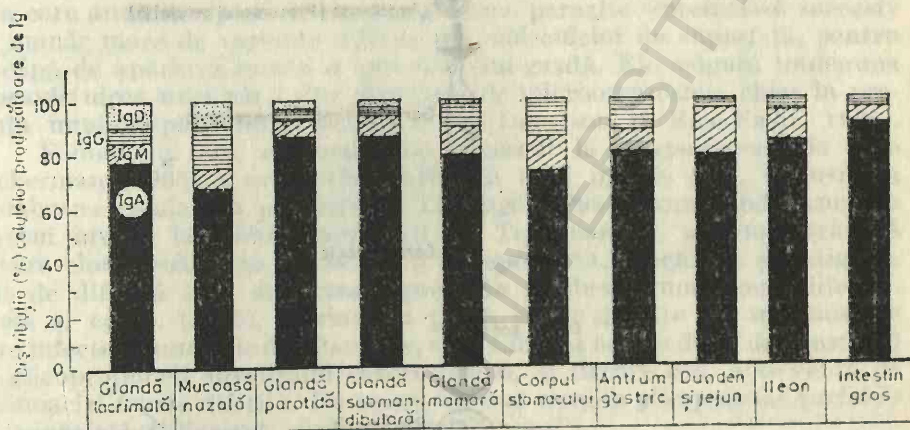


Fig. 208. — Distribuţia procentuală a plasmocitelor care produc IgA, IgM, IgG şi IgD în diferite ţesuturi secretorii umane (după Brandtzaeg 1985).

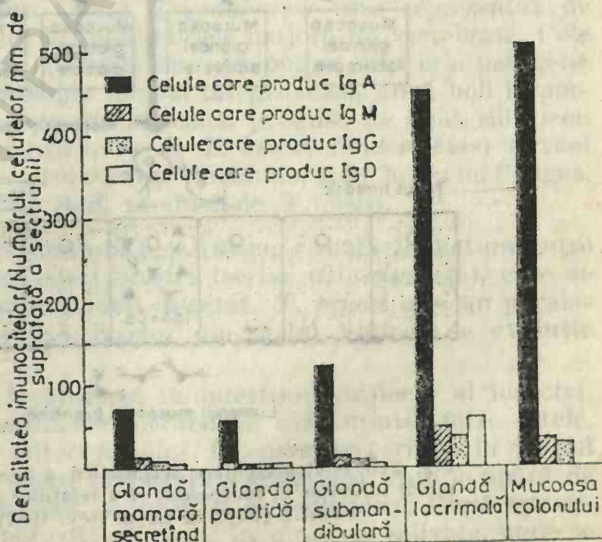


Fig. 209. — Densitatea pe mm² a plasmocitelor care produc diferite izotipuri de Ig, în diferite ţesuturi secretorii umane normale (după Brandtzaeg, 1987).

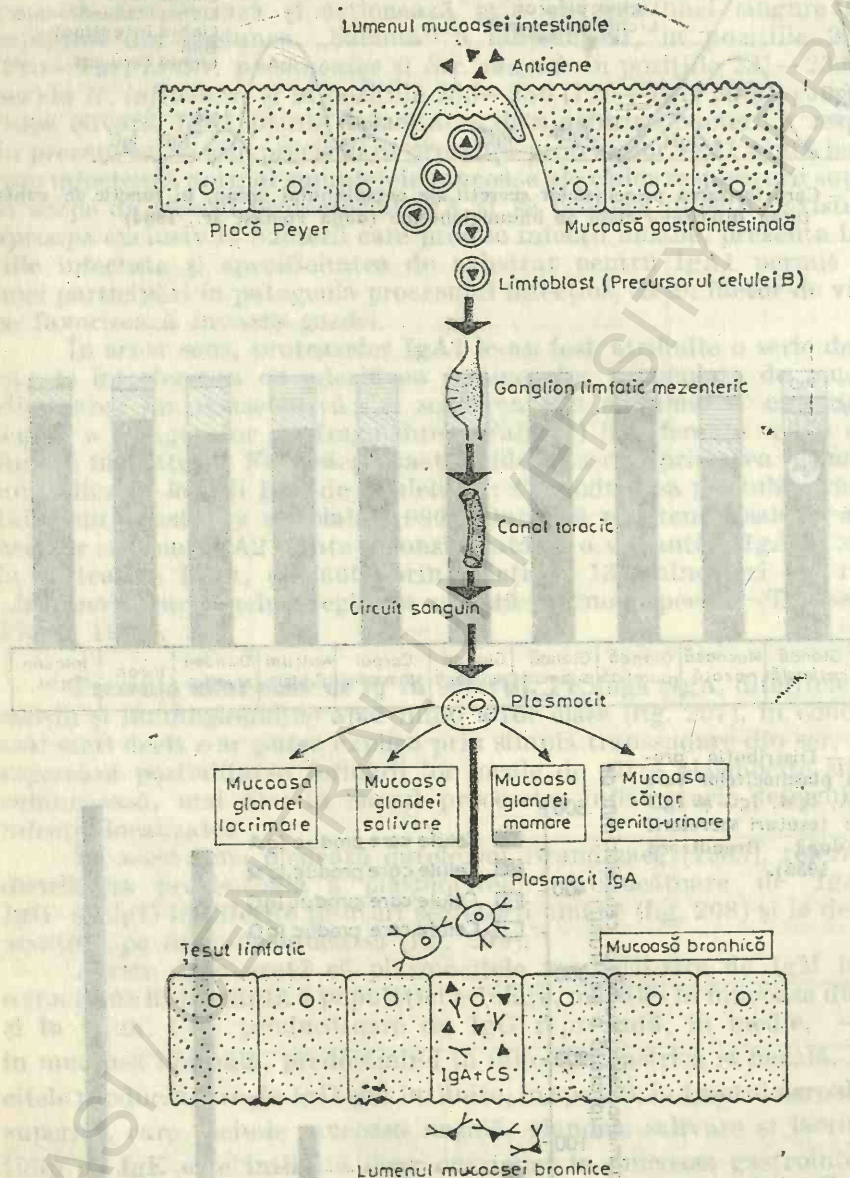


Fig. 210. — Reprezentare schematică a ansamblului sistemului imunitar al mucoaselor și a relațiilor dintre GALT și BALT (după de Laval Rey, 1987).

Mecanisme de evitare a răspunsului imun. Variația antigenică

(Pl. 27)

„Cheia succesului tripanosomelor este capacitatea lor de a evita răspunsul sistemului imunitar al mamiferelor"

J. E. Donelson, M. J. Turner

Variația antigenică la *Trypanosoma*

Sub denumirea de variație antigenică este cunoscut mecanismul prin care anumite specii de microorganisme parazite sintetizează succesiv un număr mare de variante diferite ale moleculelor de suprafață, pentru a scăpa de apărarea imună a organismului-gazdă. Ele asigură totdeauna supraviețuirea unei părți din populația de microorganisme, chiar în prezența unui răspuns imun foarte activ (Donelson și Rice-Ficht, 1985).

Fenomenul este cel mai bine cunoscut la *Trypanosoma*, la care Vickerman (1965) a evidențiat existența unui înveliș gros, ce acoperă membrana celulară a parazitului. Le Page (1968), examinînd structura acestui înveliș la diferite populații de *Trypanosoma*, a demonstrat că fiecare clonă poartă pe suprafață o glicoproteină, biochimic și antigenic atît de diferită încît ar putea reprezenta produsele unor gene diferite. Cross și colab. (1976), lucrînd cu patru clone diferite de tripanosome care infectau animalele de laborator, au confirmat aceste date, demonstrînd că glicoproteinele învelișului extern aveau, în fiecare caz, o secvență de aminoacizi foarte diferită. De aceea au fost numite *glicoproteine variabile de suprafață* („*V*ariant *s*urface *g*lycoproteins").

Biologia tripanosomelor. Genul *Trypanosoma* este reprezentat de protozoare flagelate, parazite la toate clasele majore de vertebrate. Cele mai studiate, pentru rațiuni medicale sau economice, sînt cele patogene pentru om și mamifere. Patologia umană înregistrează două boli importante și anume: 1) boala somnului africană, produsă de două subspecii de *Trypanosoma* (*T. brucei gambiense* și *T. brucei rhodensiense*) virtual identice din punct de vedere structural și biochimic, și 2) boala lui Chagas, mai răspîndită în America de Sud, produsă de *T. cruzi*.

Ciclul de evoluție. Tripanosomele africane circulă în natură între mamifere și om, prin intermediul muștei tse-tse (*Glossina* sp.), care se infectează sugînd sîngele unui animal infectat. *T. brucei* este un parazit monocelular pleomorf, datorită fazelor din ciclul normal de evoluție (fig. 211).

Paraziții ingerați se localizează în intestinul mijlociu al insectei, unde suferă o serie de modificări metabolice evidențiate, între altele, prin reactivarea biogenezei mitocondriilor. În cursul trecerii lor în stadiul prociclic, tripanosomele își pierd învelișul de suprafață, care le apără de sistemul imunitar al mamiferelor, și încep să se multiplice. După aproximativ trei săptămîni, unii paraziți migrează în glandele salivare, unde se diferențiază la formele metaciclice, care își refac învelișul extern protector,

dar nu se mai divid. În această fază, o muscă infectată conține ~ 50 000 de forme metaciclice (Donelson și Rice-Ficht, 1985). Ciclul se închide cînd o muscă infectată inoculează unei gazde sensibile, odată cu saliva, ~ 10^3—10^6 paraziți. Aceștia produc inițial o leziune locală, din care tripanosomele migrează în limfă și în circulația sanguină. În sînge, ele

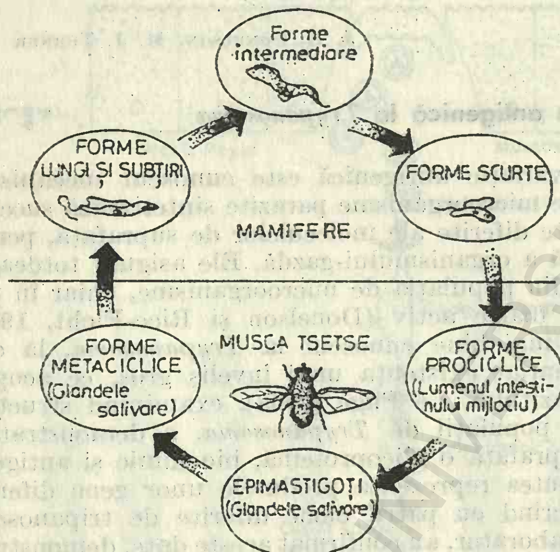


Fig. 211. — Reprezentarea schematică a ciclului de viață bifazic la *Trypanosoma brucei*.

se multiplică prin diviziune directă și suferă o serie de modificări morfologice și metabolice inițiale. Singura lor reacție producătoare de energie rămîne glicoliza, iar mitocondria unică este redusă la o protomitocondrie, lipsită de un lanț respirator funcțional. În această fază, tripanosomele poartă pe suprafață învelișul gros metaciclic și implicit glicoproteinele variabile de suprafață (GVS).

Infecția sanguină este caracterizată de valuri succesive de parazitemie, care se succed la fiecare 7—14 zile, însoțite de fiecare dată de exprimarea unui tip de GVS, biochimic și antigenic, diferit de cel anterior (fig. 212). Donelson și Rice-Ficht (1985) au observat că tulpinile de *T. brucei* de laborator își schimbă spontan tipul de GVS, cu o frecvență de 10^{-4}—10^{-6} per generație. Ordinea de apariție a variantelor ar fi aleatorie, deși, după unii autori, unele variante ar apărea mai frecvent. Capbern și colab. (1977) au descris la iepurii infectați cu *T. equiperdum* apariția a 100 de GVS antigenic diferite. În acest proces, datorită incapacității sale de a reacționa rapid cu un anumit antigen nou, răspunsul imun al gazdei are doar rolul de a selecționa variantele rezistente, care vor iniția faza de parazitemie următoare.

Mecanismul recăderilor. Rolul GVS. După Donelson și Turner (1985), la începutul infecției cu *T. brucei*, organismele umane și animale se apără, producînd un răspuns imun însoțit de sinteza de anticorpi față de glico-

proteinele prezente în faza respectivă pe suprafața paraziților infectanți. Ca urmare, aproximativ 99% dintre aceștia mor, dar cele cîteva tripanosome care supraviețuiesc își formează un nou tip de GVS, față de care anticorpii formați anterior sînt ineficienți. Ele se multiplică, determină apariția unei noi populații de paraziți care poartă un tip nou de GVS.

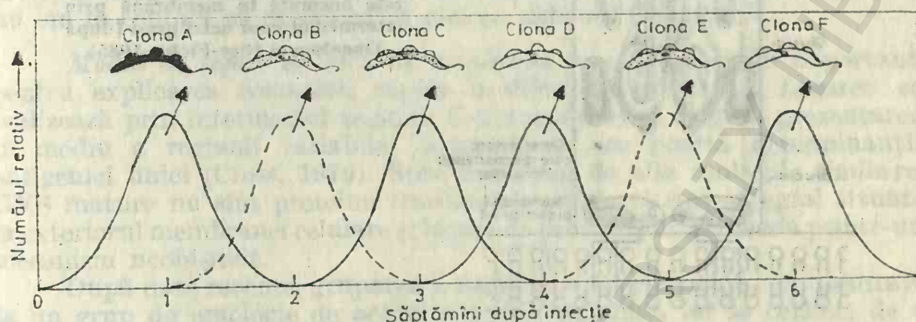


Fig. 212. — Reprezentare schematică a valurilor de parazitemie determinate de variația antigenică la *Trypanosoma*. În cursul infecției cronice apar succesiv noi tipuri antigenice de glicoproteine variabile de suprafață A → F, rezistente la anticorpii protectori formați anterior (după Donelson și Rice-Ficht, 1987).

Aceștia induc un nou răspuns imun, determinînd sinteza unui tip nou de anticorpi care distrug din nou ~99% din populația de tripanosome, dar cele care între timp și-au schimbat tipul de GVS rămîn viabile și regenerează o altă populație modificată (un nou heterotip). Infecția continuă cu recăderi succesive și parazitemii masive, determinate de variantele antigenice nou apărute, care alternează cu remisiuni determinate de intervenția răspunsului imun. Niciodată însă acțiunea acestuia nu reușește să distrugă toate tripanosomele, în așa fel încît ciclul se reia pînă cînd paraziții invadează sistemul nervos central, produc reacții inflamatorii meningeale, letargie, comă și moartea gazdei. După Doyle (1977), viteza comutării tipului de GVS în cursul infecției naturale ar fi de 10^{-5}—10^{-6} per generație de tripanosome.

Structura învelișului de suprafață. Tripanosomele sanguine au un înveliș extern, care acoperă membrana plasmatică, gros de ~12—15 nm. El reprezintă, după Turner (1982), ~5% din proteina celulară, iar după Bernards (1985), ~7—10%. Învelișul unei tripanosome conține ~1,5 × 10^7 molecule de glicoproteine variabile de suprafață (GVS).

Modelul de structură al GVS. Cross (1977) a demonstrat că GVS sînt alcătuite dintr-un polipeptid unic, avînd ~500 de aminoacizi, de care sînt legate mai multe lanțuri laterale. Studiile de cristalografie în raze X au arătat că GVS sînt pliate într-o conformație similară unui cilindru, în care peptidul formează o α-helice (fig. 213).

Regiunea variabilă a GVS cristalizează ca un dimer, respectiv în forma prezentă și pe tripanosomele vii. Capătul aminoterminal al polipeptidului, care este expus în mediu, poartă inițial o secvență scurtă peptidică „secvența semnal", avînd 20—30 de aminoacizi, care ajută

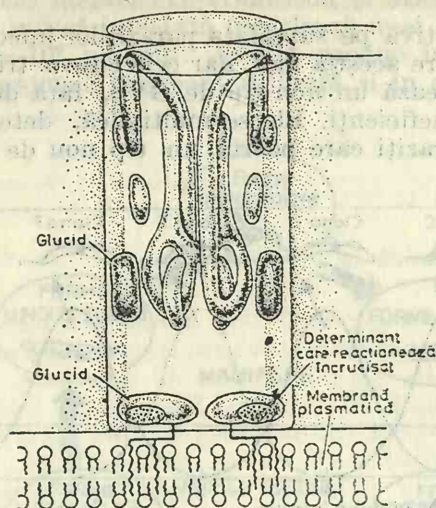


Fig. 213. — Model de structură a GVS. Regiunea variabilă este un dimer format dintr-un fascicul de proteine α-helicale, flancat de molecule de glucide. La bază se găsesc încă două glucide, determinanții ce reacționează încrucișat, pornind de la care GVS este ancorată în membrană prin intermediul unor acizi grași (după Donelson și Rice-Ficht, 1985).

la transportul GVS pe cale de formare prin membrana celulară. Ea este apoi îndepărtată prin clivare, în așa fel încît regiunea din GVS aflată efectiv în contact cu mediul și implicit cu sistemul imunitar este regiunea variabilă a lanțului. Ea poartă determinanții antigenici și formează circa 2/3 din polipeptid (~ 360 de aminoacizi). Această regiune are o secvență foarte diferită de la o GVS la alta și este efectiv răspunzătoare de diversitatea antigenică a acestora (fig. 214).

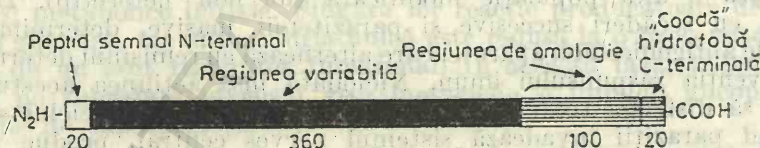


Fig. 214. — Reprezentare schematică a ordinei diferitelor segmente din structura unei glicoproteine variabile de suprafață (GVS). Datele sînt deduse din determinarea secvenței aminoacizilor la 15 GVS diferite, precum și din studiul ADN (după Donelson și Rice-Ficht, 1985).

Regiunea carboxiterminală a polipeptidului (~ 120 de aminoacizi) este relativ invariantă și, în consecință, prezintă un grad important de omologie la diferitele GVS. În funcție de secvența aminoacizilor aceste regiuni aparțin la două grupuri sau izotipuri. Omologia acestui segment ar fi rezultatul constrîngerilor impuse de evoluție, respectiv de necesitatea de a fi ancorat în membrana celulară și/sau de a fi „împachetat" strîns, pentru a forma un înveliș dens. Regiunea carboxiterminală a polipeptidului conține o secvență excedentară de 20 de aminoacizi, care este, de asemenea, îndepărtată pe cale enzimatică, înainte ca GVS nou sintetizată să apară pe suprafața membranei. Ea este înlocuită cu o structură glucidică complexă, care conține un oligozaharid neobișnuit, implicată în ancorarea de membrana celulară (Mc Conell și colab., 1983). Glucidele, de două tipuri diferite, reprezintă între 7 și 17% din masa GVS. Localizate în

treimea C-terminală a proteinei, unele flanchează polipeptidul, în timp ce altele sînt situate la baza lui. Cele de la bază includ o moleculă glucidică mică ce reacţionează serologic încrucişat. Determinantul oligozaharidic care reacţionează încrucişat („*C*ross *r*eacting *d*eterminant") pare să fie identic sau măcar foarte asemănător la toate GVS, indiferent de natura regiunii variabile. În mod normal, atît el, cît şi domeniul constant al GVS, omolog la toate moleculele, sînt mascate în structura învelişului şi nu vin în contact cu exteriorul şi nici cu sistemul imunitar.

Modul de legare al GVS de membrană este deosebit de important pentru explicarea comutării rapide a diferitelor variante. Legarea se realizează prin intermediul regiunii C-terminale, care asigură prezentarea în mediu a regiunii variabile (N-terminale), ce poartă determinanţii antigenici unici (Cross, 1979). Spre deosebire de alte molecule similare, GVS mature nu sînt proteine transmembranare, ci sînt integral situate la exteriorul membranei celulare şi legate de constituenţii acesteia printr-un mecanism neobişnuit.

După date recente, gruparea α-carboxil a GVS mature, reprezentată la un grup de omologie de acidul aspartic terminal, iar la celălalt de o moleculă de serină terminală, este legată covalent de etanolamină, care la rîndul ei este implicată într-o legătură complexă, ce include 1 mol de fosfat, glicerol, glucide şi un acid gras. La *T. brucei*, acidul gras este reprezentat de acidul miristic (C14 : 0), ceea ce sugerează că GVS poate fi legată de membrană pe calea unui derivat al fosfatidilaminei. Îndepărtarea GVS din membrană în cursul comutării se realizează prin intermediul unui mecanism enzimatic universal, care, odată activat, clivează acidul gras de porţiunea glicolipidică a GVS. În alcătuirea învelişului extern, glicolipidele variabile sînt asociate cîte două molecule identice, cu formă de bastonaşe, care, la rîndul lor, conţin, fiecare, un fascicul helical de cel puţin patru α-helixuri, lungi de 8 nm (fig. 215). Datorită acestui tip de structură, GVS sînt dispuse pe suprafaţa tripanosomelor sub forma

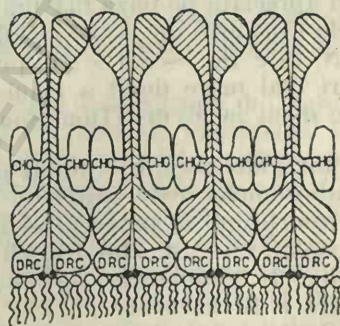


Fig. 215. — Model de grupare a GVS pe suprafaţa tripanosomelor. Stabilitatea laterală este asigurată de oligozaharide (CHO) legate de asparagină ca şi de interacţiunea GVS — GVS, în unitatea de bază dimeră. Determinanţii de reactivitate încrucişată fac parte din glicolipidul răspunzător de legarea de membrană prin intermediul unor acizi graşi (cercuri negre cu o singură „coadă"), care pătrund în stratul dublu lipidic. Împachetarea strînsă a moleculelor de GVS împiedică accesul anticorpilor la determinanţii antigenici criptici ai catenei polipeptidice (haşurat) (după Turner, 1984).

unor bastonașe strîns „împachetate" din care sînt expuși spre exterior numai cîțiva aminoacizi. Ei sînt totuși suficienți pentru a forma determinantul de antigenitate al GVS legat de o secvență în cea mai mare parte omologă. În cursul ciclului de evoluție a tripanosomelor, glicoproteinele variabile de suprafață apar inițial pe suprafața formelor metaciclice din glandele salivare ale insectelor, care sînt primele forme ce vor fi expuse acțiunii sistemului imunitar, după infectarea omului sau a animalelor (Le Roy și colab., 1977). În acest stadiu, paraziții nu pot exprima întregul repertoriu de variante antigenice ale GVS, ci numai ~15 tipuri diferite. Tipul de GVS prezent în momentul infectării gazdei animale persistă ~5—7 zile, după care este comutat la o altă variantă antigenică. Foarte frecvent, primul tip de GVS exprimat în sînge corespunde celui existent pe suprafața paraziților în momentul ingerării lor de către muscă (Essen, 1982; Hajduk, 1984).

Bazele genetice ale fenomenului de variație antigenică. În ultimii ani, variația antigenică a fost mult studiată nu numai pentru gravitatea bolilor produse de tripanosome, determinată de capacitatea lor de a contracara efectele răspunsului imun, ci și datorită faptului că ele s-au dovedit un excelent model experimental pentru studiul mecanismelor de control al exprimării genelor, pentru legarea și funcționarea proteinelor membranare, structura și replicarea telomerilor cromosomali și al mecanismelor care generează diversitatea biologică în general.

Structura genetică a tripanosomelor. Deși fenomenul de variație antigenică este atît de important și relativ mult studiat în ultimii ani, cunoștințele referitoare la structura genetică a tripanosomelor sînt foarte sumare. Ca și în cazul altor eucariote inferioare, numărul cromosomilor nu a fost încă determinat, deoarece ei nu condensează suficient în cursul ciclului celular pentru a fi evidențiați prin tehnicile citologice. Chiar gradul de ploidie al parazitului nu este cert, deși unele date sugerează că ar fi diploid (Tait, 1980).

Mărimea genomului apreciată pe baza măsurătorilor de complexitate cinetică a ADN (analizele Cot) este de $\sim 3{,}7 \times 10^7$ pb, în timp ce conținutul nucleului în ADN este de $\sim 8{,}6 \times 10^7$ pb. Mărimea genomului haploid este de ~10 ori mai mare decît a celui de la *Escherichia coli* și de 2—3 ori mai mare decît la levuri (Donelson și Rice-Ficht, 1984).

Numărul cromosomilor. Date recente (Shooff și colab., 1983) demonstrează că genomul tripanosomelor este împărțit într-un număr foarte mare de molecule ADN aparținînd la patru clase de mărime: 1) aproximativ 100 de minicromosomi, cu g.m. 50—100 kb; 2) 5—7 molecule de ADN de ~200—700 kb; 3) 3 molecule de ~2 000 kb și 4) cîteva molecule prea mari pentru a fi măsurate.

Structura genelor GVS. Genele care codifică GVS sînt răspîndite în întreaga structură a genomului. Numărul lor este apreciat la cîteva sute per genom, putînd ajunge chiar la 1 000. Ținînd seama de faptul că ARNm care codifică GVS are ~1 600 baze, cantitatea de informație genetică implicată în formarea a 1 000 de gene GVS a fost apreciată la $\sim 1{,}6 \times 10^6$ pb, respectiv ~4% din genom, raportată la dimensiunea

minimă determinată ($3,7 \times 10^7$ pb). Unitatea efectivă de transpoziție, care stă la baza variației antigenice este însă mult mai mare decît gena ce codifică GVS și ar corespunde la ~2 500—3 500 pb. Această diferență se explică prin faptul că gena propriu-zisă este flancată la ambele extremități de secvențe nucleotidice adiționale care mediază integrarea ei la nivelul situsului de exprimare. Datorită acestei particularități, van der Ploeg și colab. (1983) apreciază că, în total, 9% din genom este utilizat pentru codificarea și rearanjările genelor care codifică GVS. Aceasta reprezintă în mod evident o sarcină genetică împovărătoare pentru organism, dar, în același timp, un preț mic pentru capacitatea lor de a supraviețui răspunsului imun, într-un mediu bogat în nutrienți, cum este sîngele, chiar în prezența anticorpilor.

Repertoriul global al genelor GVS conține și o serie de gene foarte asemănătoare la nivelul secvenței N-terminale. Numărul acestor „izogene" înrudite, asociate cu un singur tip de antigen (respectiv cu o anumită GVS dată), poate varia între 2 și 12. Membrii acestor „familii multigenice" nu sînt grupați, ci dispersați în structura informației genetice. Existența lor ar fi corelată cu unele transpoziții duplicative ale genelor GVS, realizate în cursul comutărilor antigenice.

Mecanismul molecular al comutării tipului de GVS. Studiile referitoare la bazele genetice ale variației antigenice la tripanosome au demonstrat că genele care codifică glicoproteinele individuale nu sînt formate prin recombinarea unor segmente de gene (ca în cazul imunoglobulinelor), ci prin mecanisme diferite. Au fost propuse trei modele bazate pe unele date experimentale și pe cunoștințele de genetica microorganismelor.

1) *Modelul exprimării genelor GVS prin duplicare* are la bază ideea că genele care codifică sinteza GVS nu ar fi transcrise niciodată în localizarea lor naturală. După Bernards (1984), activarea unei anumite gene, numită *copia de bază* („Basic copy"), din structura normală a cromosomului este asociată cu duplicarea ei. Datorită poziției lor pe cromosom, cele cîteva sute pînă la 1 000 de gene „copii de bază" sînt cunoscute și sub denumirea de *gene interioare* („Interior genes"), sau *intracromosomale* („Intrachromosomal genes"), iar datorită funcției lor ca *gene principale* („Master genes") sau *gene de depozit* („Storage genes" (Donelson și Rice-Ficht, 1985).

Procesul de duplicare este urmat de transpoziția (translocația) și inserția duplicatului la un situs de exprimare, localizat în altă parte a genomului, apropiat de telomer, înainte ca să înceapă transcrierea genetică. Copia suplimentară a genei este numită *copie legată de exprimare* („Expression linked copy") (Hoeljmakers, 1980) (fig. 216).

Recombinarea „copiei legată de exprimare" (CLE) ar avea loc într-o regiune de omologie a ADN, în apropierea telomerului, dar nu obligatoriu la nivelul aceleiași secvențe de baze (Borst și Cross, 1982). Comutarea de la o genă GVS la alte implică îndepărtarea și degradarea CLE ce a funcționat anterior, transpoziția și inserția copiei duplicate, care persistă la situsul respectiv numai atît timp cît este exprimată.

Van der Ploeg (1982) a găsit în unele cazuri gena principală („Basic copy") pe un cromosom mare și gena legată de exprimare pe un cromosom mijlociu. Aceasta demonstrează că transpoziția genei duplicate se poate

face și pe cromosomi diferiți. De asemenea, s-a demonstrat că există numeroase situsuri apropiate de telomer în care genele pot fi activate. Apropierea de telomer este necesară, dar nu suficientă. O serie de alți factori, insuficient cunoscuți, au un rol esențial în selecționarea și activarea unei singure gene GVS. După Watson și colab. (1984), transpoziția plasează copia duplicată a genei sub controlul unui promotor, care permite transcrierea ei la ARNm.

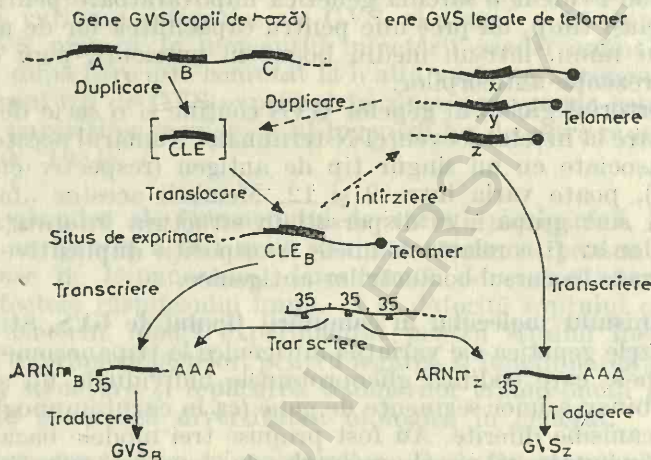


Fig. 216. — Reprezentare sintetică a evenimentelor asociate cu exprimarea secvențială a genelor GVS; A, B, C — gene pentru GVS; CLE — copie legată de exprimare; liniile subțiri indică segmente de ADN, cele groase, situate pe suprafața lor, marchează regiunile ce codifică GVS, iar cele cu grosime intermediară indică regiuni necodificatoare ale unității de duplicare/transpoziție. Liniile punctate marchează prelungiri cu lungime nedeterminată (după Donelson și Rice-Ficht, 1985).

Mecanismul descris permite exprimarea oricăreia din cele ~ 1 000 de gene individuale într-o secvență teoretic indefinită și chiar în mod repetat, deoarece persistența „copiei principale" („master") a genei permite comutarea reversibilă stop — start.

2) *Modelul de activare neduplicativă.* Williams și colab. (1979, 1983) au arătat că unele gene GVS pot fi exprimate fără duplicare și transpoziție dacă sînt situate, în mod normal, într-un situs apropiat de telomer. După Donelson și Turner (1985), ~ 50% din genele studiate par să fie situate în genom aproape de un telomer, în special în cazul celor localizate pe minicromosomi. Unele gene, ca de exemplu gena 221 de la *T. brucei*, pot utiliza alternativ ambele modalități (duplicativă și neduplicativă) de activare.

3) *Modelul „casetei".* Comutarea rapidă a diferitelor variante ale glicoproteinelor variabile de suprafață este explicată, de unii autori, printr-un mecanism asemănător celui descris pentru interconversia tipului de încrucișare la levuri. Studiul genetic al levurii *Saccharomyces cerevisiae* a arătat că aceasta prezintă două tipuri de încrucișare, notate convențional

a şi α, conceptual echivalente tipurilor sexuale descrise la alte organisme. Ea prezintă fie un ciclu de viaţă heterotalic *, în care tipul de încrucişare este foarte stabil, fie unul homotalic **, în care acesta este foarte instabil. Studiul ciclului de viaţă la *S. cerevisiae* a arătat că sporii individuali şi celulele haploide formate din ei (capabile de diviziune mitotică) au tipul de încrucişare fie *a*, fie α. Cele două tipuri de celule fuzionează pentru a forma celule diploide (*a*/α). La unele tulpini de *S. cerevisiae*, tipul de încrucişare este relativ stabil, în timp ce la altele se schimbă rapid, putînd fi convertit dintr-un tip într-altul (a ⇆ α) aproape la fiecare generaţie de celule. Aceste modificări sînt atît de rapide încît nu pot fi explicate prin nici un mecanism convenţional.

Analiza genetică a demonstrat că la *S. cerevisiae* celulele normal haploide prezintă pe cromosomul III, trei locusuri genetice care poartă informaţie pentru tipul de încrucişare (fig. 217):

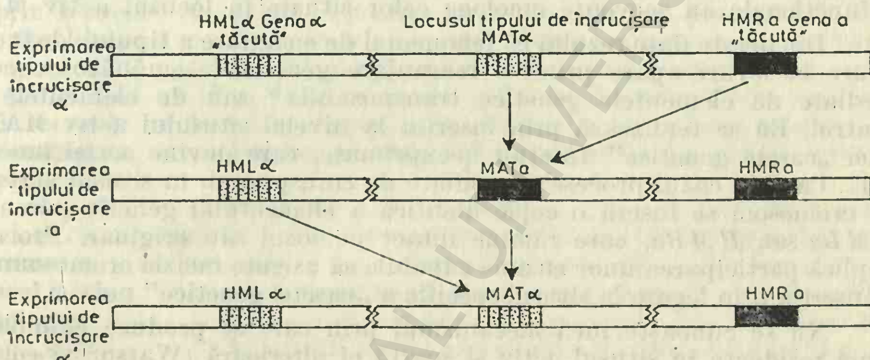


Fig. 217. — Modelul „casetei" de interconversie a tipului sexual la *levuri*, *activ* probabil şi în variaţia antigenică la *Trypanosoma*. Tipul de încrucişare *a* sau α la *Saccharomyces cerevisiae* este determinat de exprimarea genei *a* sau α în locusul tip de încrucişare (MAT). Pe acelaşi cromosom există, la nivelul unor locusuri distincte (HML şi HMR), copii „tăcute" ale genelor tipului de încrucişare. Ele se pot insera cu mare frecvenţă în locusul MAT, astfel încît „sexul" celulei de levură se poate schimba, virtual continuu. Mecanismul de mobilizare şi inserţie este similar celui al transpozonilor (după Watson, 1981).

1) situsul de exprimare activă a tipului de încrucişare, care poartă fie alela *a*, notată *MATa* („*M*ating *t*ype gene *a*"), fie alela α (*MAT*α). El este situat la 23 cM la dreapta centromerului;

2) pe braţul stîng al cromosomului III se găseşte o copie „tăcută" („Silent copy"), neexprimată, de informaţie genetică de tip α, denumită *HML*α („Haploid mating links");

3) pe braţul drept al cromosomului, la ~ 60 cM de locusul activ MAT, este prezentă o copie „tăcută" a genei de tip *a*, notată convenţional *HMRa* („Haploid mating-type right").

* Heterotalism = capacitatea de a forma diploizi numai între celule cu tipuri de încrucişare diferite, derivate din culturi monosporale (fertilitate încrucişată obligatorie).

** Homotalism = capacitatea de a forma diploizi de la o cultură iniţială dintr-un singur spor (capacitate de autofertilitate).

Pe baza acestor date, Hicks, Strathern și Herskowitz (1977) au elaborat *modelul casetei* („Cassette model") de interconversie a tipului de încrucișare a levurilor. În acord cu acest model, schimbarea tipului de încrucișare este rezultatul unei comutări genetice („Genetic switch") efectuat sub o serie de controale de ordin genetic și fiziologic. El se realizează prin inserția în situsul activ de pe cromosomul III a uneia din cele două „casete" sau „blocuri" de informație genetică, *HMLα* sau *HMRa*. Acest locus este activ și permite exprimarea informației genetice corespunzătoare tipului de încrucișare din „casetă", deoarece este adiacent unui promotor activ sau altui situs de control esențial. Prin acest mecanism, la fiecare diviziune celulară, celulele de tip *a* se schimbă în celule de tip α, iar cele α devin *a*, prin îndepărtarea genei rezidente anterior, cu o frecvență de ~ 90%. Aproximativ 5% din celule nu prezintă nici o modificare și la ~ 5% gena rezidentă în locusul MAT este înlocuită cu o copie de același tip. Modelul se bazează pe observația că genele *a* și α nefuncționale au secvențe omologe celor situate în locusul activ MAT.

Din aceste date rezultă că fenomenul de comutare a tipului de încrucișare la levuri apare printr-o rearanjare genetică asemănătoare celor mediate de elementele genetice transpozabile * sau de elementele de control. Ea se realizează prin inserția la nivelul situsului activ MAT a unei „casete genetice" anterior neexprimate, care devine astfel funcțională. Ca și în cazul proceselor mediate de transpozoni, în situsul activ de pe cromosom se inseră o copie identică a elementului genetic parental, *HMLα* sau *HMRa*, care rămîne intact pe locul său originar. Procesul implică participarea unor enzime capabile să asigure incizia cromosomului și inserția prin legare la situsul specific a „casetei genetice" noi.

Nu se cunoaște încă mecanismul prin care se produce eliminarea genei rezidente în situsul activ și soarta ei ulterioară (Watson și colab., 1983).

Modelul sugerează, după Herskowitz și Oshima (1983), funcția unui „cap de playback" de casetofon pentru o bandă magnetică, pe care este înregistrată informația *a* sau α. Genele care conțin informația tăcută *HMLα* și *HMRa* nu sînt exprimate, pentru că regiunea corespunzătoare din bandă nu este adiacentă situsului de control funcțional („capului" de citire al casetofonului). Interconversia tipului de încrucișare (fenomenul „flip-flop") are loc prin deplasarea „casetei" la nivelul locusului activ.

Sistemul casetelor multiple. Modelul casetei furnizează un mecanism logic pentru a explica situația celulelor care se pot comuta la una din mai multe stări diferite.

Presupunînd existența unei celule al cărui genom conține mai multe „casete tăcute" (A, B, C, D ...) și a unui locus activ, analog locusului MAT de la *S. cerevisiae*, se poate explica exprimarea oricărei „casete" inserată în locusul respectiv : o celulă cu caseta A la locusul activ prezintă fenotipul A și se poate comuta la oricare alt fenotip, prin substituirea casetei A cu una diferită. După Hoeijmarks și colab. (1980), acest mecanism ar putea explica variația antigenică la tripanosome, la care numărul

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 120.

„casetelor" este apreciat de la cîteva sute la $\sim$1 000, ca fiind consecutivă transpoziţiei lor de la un situs latent la unul activ.

Între modelul originar şi cel posibil, activ la tripanosome, există o deosebire semnificativă. La levuri, procesul are o anumită polaritate, care constă în comutarea preferenţială de la un tip de încrucişare iniţial la tipul de încrucişare opus. În celulele cu „casete" multiple se pot imagina două situaţii, corespunzînd fie unei înlocuiri aleatorii, fie cazului în care o „casetă" activă stimulează propria ei înlocuire de către o altă casetă. În acest caz, celulele cu fenotipul α ar putea apărea înainte de cele cu fenotipul β etc.

Surse adiţionale de diversitate antigenică a GVS. Pays (1983) a demonstrat că, uneori, copia funcţională a unei gene legate de exprimare poate fi produsă nu prin duplicarea unei gene de bază („Basic copy"), ci prin recombinarea unor segmente provenind din cel puţin două gene diferite, legate de telomer. În felul acesta, fiecare segment codifică o parte din gena GVS rezultată. El consideră că dacă acest fenomen ar fi general, ar putea furniza alte cîteva sute de variante de gene GVS. Prezenţa unor secvenţe nucleotidice repetitive în tandem, în apropierea telomerilor, pledează pentru posibilitatea producerii de recombinări genetice la nivelul respectiv.

Recent, Donelson (1985) a observat că, în unele cazuri, copia genei asociată cu exprimarea (CLE) nu este distrusă în momentul comutării spre exprimarea altei gene GVS. Ea „întîrzie" şi persistă pentru un timp în situsul de exprimare. Pe această bază, el consideră că unele gene apropiate de telomer au fost anterior copii asociate cu exprimarea, care au „întîrziat" şi au „supravieţuit" la situsul lor de activitate („Lingering genes") după ce s-a produs comutarea la o genă nouă. Pe baza datelor actuale este evident că toate genele cu situs apropiat de telomer sînt „expuse", gata pregătite pentru exprimare.

Factorul care activează numai una dintre ele, împiedicînd exprimarea celorlalte nu este cunoscut. Teoretic, există mai multe posibilităţi de activare: 1) intervenţia unui promotor „flotant"; 2) acţiunea unui element de control mobil, de tipul elementelor genetice transpozabile, ca stimulator al transcrierii genetice, care se poate deplasa de la un telomer la altul. Inserţia lui ar declanşa exprimarea genei, iar „plecarea", blocarea ei; 3) intervenţia unei proteine de reglare („transacting protein") (Donelson şi Rice-Ficht, 1985).

Variaţia antigenică la *Neisseria gonorrhoeae*

Capacitatea *N. gonorrhoeae* de a infecta şi invada celulele de pe suprafaţa mucoaselor sensibile depinde, cel puţin parţial, de posibilitatea aderării lor de acestea prin intermediul fimbriilor. Meyer, Mlawer şi So (1982) au arătat că diferitele tulpini izolate de la bolnavi au fimbrii deosebite din punct de vedere antigenic. Datorită acestor diferenţe, anticorpii produşi faţă de un tip de fimbrii nu sînt activi faţă de alte tipuri diferite. Variaţia antigenică este determinată de variabilitatea secvenţei aminoacizilor în regiunea carboxiterminală a proteinei fimbrilina. Celulele de *N. gonorrhoeae*, care exprimă un anumit tip de fimbrii (fim^+),

pot trece în starea *fim⁻* (nefimbriată), pentru a reveni la starea *fim⁺*, în care formează fimbrii alcătuite din alt tip de proteine. S-a demonstrat că bacteria are cîteva sute de gene care codifică fimbrilina, dintre care este exprimată la un moment dat numai una (probabil cea situată la un anumit locus de exprimare). Îndepărtarea genei respective din locusul de exprimare corespunde stării *fim⁻* și este urmată de înlocuirea de o altă genă, care asigură formarea unor fimbrii diferite antigenic*. Comutările *fim⁺ → fim⁻ → fim⁺* sînt însoțite de rearanjări ale genelor *fim*, după un mecanism asemănător celui descris la tripanosome.

*

Variația antigenică este un mecanism deosebit de important pentru supraviețuirea tripanosomelor și altor microorganisme în natură. Stocul de gene combinat al tripanosomelor furnizează, teoretic, o cantitate de informație genetică prin care se pot produce un număr infinit de glicoproteine variabile de suprafață distincte. Datorită acestui mecanism, moleculele și celulele efectoare ale răspunsului imun, precum și vaccinurile nu pot proteja față de infecțiile cu tripanosome, deși acestea își petrec cea mai mare parte a ciclurilor de viață în organismul mamiferelor, libere în circulația sanguină.

Strategii virale de evitare a răspunsului imun

În cursul evoluției au apărut o serie de mecanisme, care permit virusurilor să evite efectele neutralizante ale răspunsului imun și să persiste în natură. Aceste mecanisme funcționează, după Mahy (1985), la trei nivele diferite, pentru a asigura:

1) *Persistența virusului în populație* prin variație antigenică, respectiv prin: a) derivă antigenică și b) substituire sau reasortare antigenică.

2) *Persistența virusului în organismele individuale* prin: a) integrarea ADN viral în celulele somatice și/sau germinale: b) infecții latente neuronale, cu posibilitatea de reactivare periodică; c) infecție persistentă a celulelor țesutului limforeticular, cu formarea de complexe virus infecțios — anticorpi.

3) *Persistența virusului în celule in vitro* prin: a) replicare limitată și stare de purtător consecutivă; b) infecție echilibrată fără efecte citopatice; c) transfer intercelular, fără maturarea virusului (persistență intracitoplasmatică); d) infecție latentă prin integrarea genomului viral în genomul celulei-gazdă.

* Pe baza particularităților de structură, funcție și determinism genetic, Ottow (1975) împarte structurile filamentoase neflagelare ale bacteriilor în: 1) *pili* (de sex): apendice filamentoase codificate de gene situate pe plasmide cu caracter de conjugon, implicate în transferul ADN bacterian prin conjugare, acționînd și ca receptori pentru anumiți fagi; 2) *fimbrii*: apendice filamentoase codificate de gene cromosomale, cu rol în adeziunea bacteriilor de diferite substraturi animate (celule, alte microorganisme) sau neanimate, fără rol în transferul ADN viral, plasmidial sau cromosomal. Cei doi termeni sînt folosiți încă nediferențiat și structurile implicate în aderența *N. gonorrhoeae* sînt frecvent descrise în literatura de specialitate sub denumirea de pili.

Variaţia antigenică a virusurilor

Multe infecţii virale determină, cel mai adesea, o imunitate de lungă durată. Apreciată prin persistenţa anticorpilor serici, ea poate depăşi, în cazul infecţiilor virale sistemice, 40—50 de ani. Acest fenomen ar fi condiţionat, cel puţin în parte, de lungimea perioadei de incubaţie, care permite practic elaborarea unui răspuns imun de tip secundar, şi de stabilitatea genetică a virusurilor respective, care au un număr limitat de serotipuri sau, uneori, chiar unul singur (Girard şi Hirth, 1983). În alte cazuri însă, datorită capacităţii virusurilor de a suferi frecvente remodelări antigenice, sub influenţa „presiunii imunologice", imunitatea este aparent de foarte scurtă durată.

Cercetările de laborator şi epidemiologice asupra virusurilor gripale (*Orthomyxovirus influenzae*) au permis descrierea a două mecanisme majore de variaţie antigenică:

1) **Deriva antigenică** („Antigenic drift") corespunde unor modificări limitate în structura genomului viral, determinate, în principal, de mutaţii punctiforme. Ele sînt asociate cu modificări în structura spiculelor virale (hemaglutinine şi neuraminidaze), care au un rol esenţial în infectarea celulelor sensibile. Mecanismul asigură apariţia de *noi variante* ale aceluiaşi tip de virus gripal, insensibile în reacţiile de seroneutralizare la acţiunea anticorpilor produşi de virusul originar.

2) **Substituirea antigenică** („Antigenic shift") este un fenomen mai complex, determinat de o reasortare a segmentelor de ARN genomic cînd o celulă este infectată simultan de două virusuri diferite (fig. 218). Mecanismul produce modificări majore în structura glicoproteinelor virale. Acest fenomen ar fi răspunzător de apariţia de noi tulpini de virus gripal de-a lungul anilor. Caracterizate prin prezenţa unor hemaglutinine şi/sau neuraminidaze de tip nou, aceste tulpini ar fi rezultatul unor reasortări genetice („pseudorecombinări"), între un virus gripal uman şi un virus gripal de provenienţă animală.

Fig. 219 prezintă schematic mecanismul probabil de apariţie a virusului gripal uman tulpina A/Hong-Kong/68 (H_3N_2) (H-hemaglutinină; N — neuraminidază; cifrele indică tipul antigenic). Ipoteza presupune o reasortare a segmentelor genomice virale * între varianta A/asiatică/68 a virusului ipotetic uman Singapore (H_2N_2) şi un virus înrudit cu virusurile gripale de la raţă şi de la cal. În ultimii ani se atribuie un rol important păsărilor, în circulaţia virusului gripal în natură după schema: păsări sălbatice → păsări domestice → mamifere → om. Transmiterea la păsări s-ar face în special prin intermediul apei (virusul gripal se replică la raţă în celulele epiteliului intestinal şi rezistă în apă 5 zile la 20°C şi 25—30 de zile la 4°C). În felul acesta, după Girard şi Hirth (1983), tulpinile de virus care determină pandemiile de gripă s-ar forma prin reasortarea genetică a unui virus aviar, care aduce o componentă antigenică nouă

---

* Genomul virusului gripal este alcătuit din opt segmente de ARN m.c., cu lungimi diferite, conţinînd informaţia genetică pentru principalele proteine virale identificate: polimerazele P_3, P_1, P_2, HA (hemaglutinina), NP (nucleoproteina) NA (neuraminidaza), MP (proteina matricei) şi NS (proteina nestructurală) (în ordinea greutăţii moleculare descrescînde).

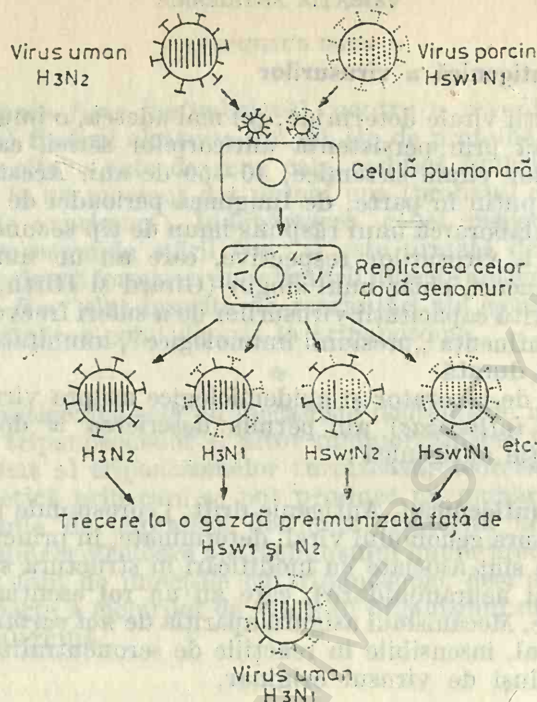


Fig. 218. — Reasortarea genetică între două tulpini de virus gripal uman H_3N_2 tulpina A (Hong-Kong/68) și virusul porcin HSw1N1 (tulpina A/porc/Iowa/30) (după Girard și Hirth, 1980).

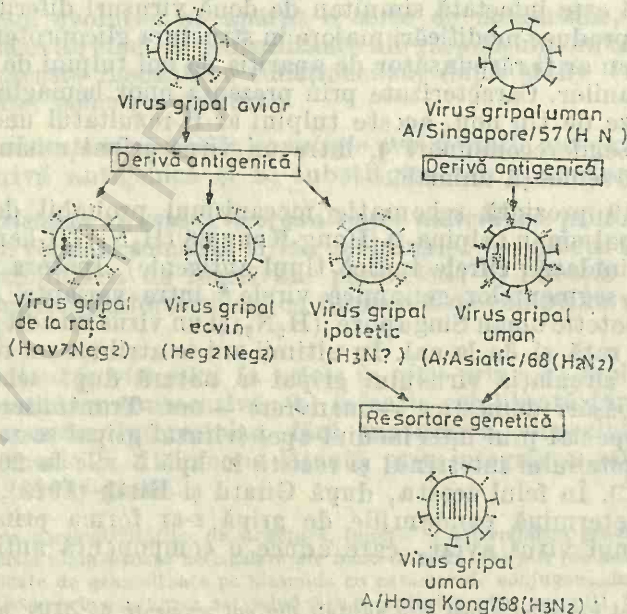


Fig. 219. — Reprezentare schematică a originii prezumptive a tulpinii Hong-Kong de virus gripal uman, prin reasortarea genetică între virusul gripal uman asiatic Singapore și un *Myxovirus* animal neidentificat înrudit cu virusul de la rață și de la cal (după Girard și Hirth, 1980).

și un virus uman, ce condiționează tropismul pentru om. Virusul nou format este expus „presiunii imunologice”, care tinde să selecționeze mutantele rezistente la seroneutralizare. Faza de derivă antigenică urmează celei de substituire prin reasortare genetică și asigură apariția de noi variante de virus. În fapt, imunitatea antigripală este tot de lungă durată, dar virusul se modifică frecvent și nu poate fi neutralizat de anticorpii formați în urma infecțiilor anterioare.

Pe plan general, Mims (1972) evidențiază două particularități core-late cu variația antigenică:

1) Ea funcționează ca mecanism important de evitare a răspunsului imun, în special în infecțiile virale ale căilor respiratorii și digestive. Explicația ar fi legată de faptul că rezistența mucoaselor la reinfecție este frecvent de scurtă durată, probabil datorită memoriei de scurtă durată a sistemului imunitar propriu. Durata între infecția inițială și producerea de virus este scurtă în cazul infecțiilor limitate la suprafața epitelială, astfel încît un virus modificat antigenic are un avantaj selectiv, putînd să infecteze și să se replice înainte ca să poată genera un răspuns local secundar semnificativ.

În cazul infecțiilor sistemice, variantele antigenice virale sînt confruntate cu dificultăți mult mai mari: a) perioadele de incubație sînt de 2—3 ori mai mari; b) anticorpii preexistenți, chiar dacă neutralizează mai puțin eficient virusurile modificate, sînt plasați strategic pentru a interfera cu răspîndirea virusului în organism; c) răspunsul imun secundar, chiar dacă nu a putut bloca inițierea infecției, intră în acțiune și împiedică răspîndirea virusului în organism.

2) Ca fenomen de adaptare, menit să evite imunitatea gazdei, variația antigenică este mai importantă pentru speciile cu viață lungă (om, cal etc.), care suferă reinfecții multiple în cursul vieții. În cazul speciilor cu viață scurtă, reînnoirea rapidă a populațiilor creează oricum suficient de repede organisme noi, neinfectate, sensibile, pentru a permite multiplicarea și transmiterea virusurilor.

Persistența virusului în organism

Rezultatul final al unei infecții virale depinde de proprietățile specifice ale virusului, ale celulelor în care se replică și de activitatea sistemului imunitar al organismului-gazdă, la rîndul său modulată de mai multe sisteme efectoare ale acesteia (Oldstone, Sissons și Fuzinami, 1985).

Au fost descoperite trei strategii care, uneori, pot asigura persistența infecțiilor virale pe toată durata vieții unui organism.

1) **Integrarea genomului viral în structura ADN celular**, fără exprimarea genelor virale, a fost descrisă la retrovirusuri. Ea evită complet răspunsul imun și permite, uneori, transmiterea verticală a virusului, de la o generație de celule la alta. Fenomenul este caracteristic unor lentivirusuri („Slow virus”), ca Visna și Maedi de la ovine sau anemia infecțioasă a cailor, care pot persista mai mulți ani în prezența răspunsului imun. El este tipic și pentru virusul HIV — tip 1 („Human immunodeficiency virus”), care produce SIDA, în perioada premergătoare apariției

semnelor clinice (prin deteriorarea sistemului imunitar, perioadă care la unele organisme se poate prelungi pe toată durata vieții lor).

În cursul acestei forme de persistență a virusului, în general, celulele care conțin genomul viral integrat nu sînt recunoscute eficient de sistemul imunitar și nu sînt atacate. Ele pot elibera periodic virus infecțios, producînd viremie și episoade acute, determinate de multe ori de un virus antigenic diferit (Scott și colab., 1979). S-a demonstrat că în aceste cazuri variația antigenică este rezultatul unor mutații punctiforme, concentrate la extremitatea 3' a genomului ARN viral, care codifică o glicoproteină majoră de suprafață.

2) **Infecția latentă** a fost studiată, în special, pentru Herpes simplex virus (HSV), în relație cu infecția primară și cea recurentă, utilizînd diferite modele experimentale (infecție cutanată, genitală, oculară) pe animale de laborator.

Expunerea unui organism sensibil la infecția cu HSV poate determina o infecție primară asimptomatică. Pe măsură ce răspunsul imun limitează infecția, virusul intră într-o stare de latență care îi permite să persiste în formă inactivă, în organismul gazdei. Există numeroase probe, care atestă faptul că răspunsul imun al gazdei, care limitează infecția productivă cu HSV, poate facilita stabilirea infecției latente (Openshaw și colab., 1980). Periodic, virusul latent poate fi reactivat pentru a produce virioni infecțioși ce declanșează apariția infecțiilor recurente.

După Overall (1984), recurențele reprezintă cea mai importantă sursă de virus transmisibil. Scriba (1981) a demonstrat importanța răspîndirii virusului pe cale nervoasă, pentru stabilirea latenței. HSV inoculat în laba membrului posterior la cobai este găsit latent în ganglionii lombosacrali și dorsali. Secționarea chirurgicală a nervilor înainte de inoculare împiedică acest proces.

Sediul virusului latent. Funcțional, virusul latent este definit ca un virus care poate fi izolat din explantele tisulare (celule intacte), nu însă și din omogenatele tisulare lipsite de celule (Stanberry, 1986). În general, detectarea virusului latent este foarte dificilă. Puga (1978, 1984) a detectat secvențe de ADN viral în concentrație de 1,2–2 echivalenți genomici per celulă în faza acută și de numai $0{,}11 \pm 0{,}03\%$ în faza latentă. ARNm viral nu poate fi detectat cu tehnici avînd sensibilitatea de o moleculă transcrisă la 2 000 de celule. Cu toate acestea, mai mulți cercetători, utilizînd tehnica co-cultivării explantelor, au detectat virusul în ganglionii senzoriali, măduva spinării, pielea regiunii genitale, vagin, col uterin etc., demonstrînd posibilitatea existenței virusului și în țesuturi diferite de cel nervos.

În prezent nu se cunosc diferențele dintre starea virusului latent în ganglioni și situsurile extraganglionare. De asemenea, nu se știe dacă în compartimentele extraganglionare virusul este prezent în țesutul nervos sau în celule de altă natură și nici importanța relativă a celor două tipuri de localizări în apariția recurențelor.

Particularitățile virusului latent. VHS latent este prezent într-o stare diferită de cel infecțios, de aceea nu se replică și nu produce particule virale mature. ADN viral apare frecvent fără regiunile terminale, ceea ce

sugerează că s-ar putea găsi fie sub forma circulară, fie integrată, fie ca molecule lungi concatemere (Puga, 1984; Rock și Fraser, 1985).

Datele experimentale sugerează că stabilirea latenței ar necesita prezența timidinkinazei (TK) (mutantele TK⁻ sînt mai puțin neurovirulente și ineficiente sau chiar incapabile să producă infecții latente) și a două proteine virale (CP175 timpurie și una tardivă), al căror rol nu este cunoscut (Stanberry, 1986).

Reactivarea și recurența VSH latent poate persista toată viața organismului-gazdă, înregistrînd probabil un declin cantitativ de-a lungul anilor, reflectat între altele prin rărirea frecvenței recurențelor. O serie de factori pot influența frecvența sau amploarea reactivării lui, în timp ce alții pot altera starea imunitară, favorizînd replicarea virusului reactivat și producerea bolii recurente.

Reactivarea este un proces complex, incluzînd o serie de modificări neurobiochimice și metabolice, care permit transcrierea integrală a genomului viral anterior represat, alterînd relația dintre virus și celula-gazdă. Reactivarea are loc mai frecvent decît boala recurentă, deoarece, adeseori, răspunsul imun al gazdei poate elimina virusul reactivat înainte de a produce leziuni clinice evidente (Harbour și colab., 1983). Un rol esențial în blocarea reactivării și în împiedicarea replicării virusului în celulele epiteliale revine imunității mediate celular, cea umorală fiind fără efect.

Sursa exactă a virusului reactivat este necunoscută. Ea pare să fie cel mai frecvent ganglionii neurosenzoriali deși, după date noi, sediile extraganglionare par să aibă un rol semnificativ în conservarea genomului și exprimarea recurențelor. Virusul prezent în leziunile recurente se poate reîntoarce în ganglionii senzoriali pentru a restabili infecția latentă, dar după Klein (1985) foarte rar în același ganglion.

Rolul sistemului imunitar este de a controla extinderea reactivării după ce s-a produs. Ca probă, rata eliberării virusului, a recurențelor și morbiditatea cresc la om după imunosupresie. Imunitatea mediată celular are un rol esențial atît în controlul infecțiilor primare, cît și în menținerea latenței. În absența ei se pot produce infecții diseminate, chiar fatale (Stanberry, 1986).

3) **Infecția persistentă cu eliberare lentă de virus** („Virus shedding"). Unele virusuri umane sau animale pot persista vreme îndelungată, uneori toată viața organismului-gazdă, datorită evitării răspunsului imun. Strategia lor implică infectarea țesutului limforeticular, care permite evitarea răspunsului imun, deși unele cazuri pot exista în prezența complexelor imune și a anticorpilor circulanți (Mahy, 1985).

Cel mai bine a fost studiată starea de purtător în cazul virusului Epstein-Barr (VEB). La om, el produce infecții asimptomatice în copilărie sau mononucleoză infecțioasă la adulți, replicîndu-se inițial în epiteliile orofaringiene. VEB persistă în limfocitele B, care se comportă *in vitro*, ca „nemuritoare".

Virusul hepatitei B este întîlnit la 5–10% dintre foștii bolnavi la care antigenul de suprafață AgHBs persistă la un nivel semnificativ în ser, în prezența anticorpilor față de antigenul corpusculului central („core") viral. ADN viral este integrat în genomul celulei hepatice, reprezentînd o sursă continuă de virus, datorită unui răspuns atenuat sau

defectiv. Acest tip de persistență a fost semnalat și în cazul virusurilor choriomeningitei limfocitare, al bolii aleutine a nurcilor, al LDH (lactic-dehidrogenazei) etc.

Modularea antigenică

Sub această denumire („Antigenic modulation"; engl. „modulation" = alterarea sau modificarea amplitudinii sau frecvenței), Boyse și Oldstone (1980) au descris fenomenul de pierdere sau de diminuare a exprimării unui antigen specific pe suprafața celulelor infectate cu virusuri, în prezența anticorpilor specifici. Ele au loc cu condiția ca infecția virală să nu întrerupă semnificativ procesul de biosinteză a proteinelor gazdei. Celulele astfel modificate mențin informația virală, asigurînd persistența virusului și evitarea răspunsului imun.

Modularea antigenică a fost descrisă în cazul unei complicații foarte rare a rujeolei, panencefalita subacută sclerozantă (PESS).

La om, infecția primară este determinată de replicarea virusului în celulele epiteliale ale căilor respiratorii superioare și în țesutul limfoid asociată cu viremie și diseminare în tot corpul, probabil prin intermediul limfocitelor. Boala este urmată de o imunitate solidă, pentru tot restul vieții. Infecția persistentă și panencefalita consecutivă sînt determinate fie de pătrunderea virusului în sistemul nervos central în momentul infecției primare, fie ulterior după o perioadă de persistență temporară în celulele limforeticulare.

Mecanismul probabil de producere este dedus pe baza unor cercetări *in vitro*, care au evidențiat următoarele aspecte esențiale: Infecția normală induce un efect citopatic, determinat de fuziunea celulelor cu apariția de celule gigante și sinciții, urmată de disfuncții ce duc final la moartea celulelor. Dacă celulele sînt infectate în prezența anticorpilor, proteinele de fuziune nu se mai formează sau sînt îndepărtate de pe suprafața celulelor, care au un aspect normal, deși conțin informație genetică virală și supraviețuiesc timp îndelungat în cultură (Southern și Oldstone, 1985).

Modularea antigenului este un proces strict specific (nu poate fi produs decît de anticorpul corespunzător) și continuă cît timp anticorpii sînt prezenți în lichidul de cultură. Ea se însoțește și de modificări intracelulare ca: 1) alterarea structurii proteinei virale P (fosfoproteină cu g.m. 70 kdal), răspunzătoare de reglarea sintezei de virus; 2) anomalii ale proteinei M (de matrice; g.m. 36 kdal), urmate de modificări în recunoașterea nucleocapsidei și de inhibarea maturării virusului. Celulele infectate cresc în prezența anticorpilor cu o viteză egală cu cele normale. După îndepărtarea anticorpilor, antigenele de fuziune reapar pe suprafața celulelor, care redevin sensibile la liza imună. Datorită procesului de modulare, cantitatea de antigen pe suprafața celulelor este prea mică pentru a induce fenomenele citopatice și liza. Modularea antigenică este favorizată de faptul că poate fi produsă de o cantitate de anticorpi de 50 de ori mai mică decît cea necesară pentru liză. Ea este amplificată de prezența sistemului complement. Nu se știe dacă acest mecanism este operațional și *in vivo* (Meulen și colab., 1982).

Este probabil că foarte multe virusuri evită răspunsul imun,producînd infecții persistente, cele cunoscute reprezentînd numai partea vizibilă a aisbergului. Persistența lor *in vivo* este uneori favorizată de localizarea în situsuri relativ inaccesibile explorării (neuroni, celule endoteliale sau chiar în celulele sistemului imunitar). Depistarea lor nu este posibilă decît în măsura în care modifică semnificativ răspunsul față de un sistem-test sau dacă produc modificări patologice cu aspecte neobișnuite. După Mahy (1985), infecțiile cu virusuri latente ar putea sta la baza unora din bolile care au în prezent o etiologie necunoscută.

Persistența virusului în celule

Fenomenele de persistență virală în celule au fost studiate în special în culturi de celule *in vitro*, dar după mulți cercetători ar putea fi operante și *in vivo*, ca atare sau cu unele particularități speciale. Au fost descrise patru mecanisme diferite:

1) **Cultura purtătoare** („Carrier culture”) corespunde situației în care infecția este limitată la o mică proporție de celule din populație, care mor și eliberează virusul ce infectează din nou un număr mic de celule. Poate fi „vindecată” cu ajutorul anticorpilor. Persistența ar fi corelată cu o necesitate specifică a virusului pentru o celulă, într-un anumit stadiu al ciclului celular respectiv.

2) **Infecția echilibrată** („Steady-state infection”) implică existența unui echilibru, determinat de factori genetici, virali și celulari, care asigură replicarea virusului și eliberarea lui în mediu, fără moartea celulelor. Sînt infectate toate sau aproape toate celulele din cultură. Nu poate fi eliminată prin acțiunea anticorpilor (Hotchin, 1974).

3) **Persistența intracitoplasmatică** este caracteristică virusului choriomeningitei limfocitare cultivat în anumite linii celulare standard. Ea asigură menținerea virusului în absența virionilor din mediu. Infecțiozitatea este asociată cu structuri de tipul unor vezicule mari intracitoplasmatice ce pot transmite infecția prin contacte celulă — celulă. Extractele acelulare transmit, de asemenea,infecția celulelor standard normale. După van der Zeijst și colab. (1983), reprezintă strategia ideală de răspîndire a virusurilor în organism cu evitarea răspunsului imun.

4) **Integrarea ADN genomic viral în genomul celulei-gazdă.** Multe virusuri cu genom ADN au capacitate de integrare în genomul celulei-gazdă. În mod obișnuit, integrarea genomului complet în celulele provenite de la gazdele naturale este rară, deoarece replicarea virusului determină moartea celulelor. Integrarea ADN viral poate fi studiată numai în cazul infecțiilor abortive, caracteristice celulelor nepermisive și în mod obișnuit interesează numai o parte a genomului. Un caz aparte este cel al retrovirusurilor oncogene a căror integrare, observată frecvent, este consecința transcrierii inverse a ARN m.c. viral la ADN d.c. prin acțiunea transcriptazei inverse.

Sistemul complement

(Pl. 28–29)

Sistemul complement este format dintr-un grup complex de enzime care interacționează pentru a forma un sistem efector, capabil să determine liza unor celule invadatoare și/sau o serie de activități biologice importante, cu rol esențial în răspunsul imun.

Acțiunea sa a fost descoperită cu ocazia studiilor privind bacterioliza imună a bacteriei *Vibrio cholerae* (Pfeiffer, 1895), care au demonstrat că activitatea anticorpilor depinde de prezența unui factor termolabil, prezent în serul sanguin proaspăt, numit de Buchner (1899) *alexină* (gr. „aleksein" = a respinge) și de Bordet (1900) *complement*. Denumirile inițiale exprimau ideea, valabilă la acea dată, că sistemul complement ajută anticorpii să-și exercite funcțiile efectoare de apărare.

Studiile ulterioare au restructurat fundamental această concepție, inversînd, în primul rînd, relația dintre anticorpi și complement : celulele invadatoare sînt atacate efectiv de complement, în timp ce anticorpii au doar funcția de a identifica invadatorul și de a activa complementul. S-a mai demonstrat că sistemul complement nu este o substanță unică, fiind format din cel puțin 20 de proteine diferite, unele cu rol efector, iar altele cu rol de reglare (tabelul nr. 56). El formează 10–15% din globulinele serice normale. Concentrația sa nu este influențată de imunizare.

Tabelul nr. 56

Proprietățile fizico-chimice ale componenților și proteinelor de reglare ale complementului (după Loos, 1985)

Componentul	Greutatea moleculară (dal)	Concentrația serică (μg/l)	Coeficientul de sedimentare	Mobilitatea electroforetică	Numărul polipeptidelor și g.m.	Produșii de activare	Catenele polipeptidice (număr, g.m.)
CALEA CLASICĂ DE ACTIVARE A COMPLEMENTULUI							
C1	900 000	200–300	19				
C1q	410 000	150–180	11	γ2	18 : 6A : 24 000 18 : 6B : 23 000 18 : 6C : 22 000		
C1r	85 000	50	7	β	1 : 85 000	$\overline{C1r}$	1a : 56 000 1b : 27 000
C1s	85 000	100	4	β1	1	$\overline{C1s}$	1a : 56 000 1b : 27 000
C4	210 000	400–450	10	β1	3 : 90 000 3 : 78 000 3 : 33 000	C4a C4b	1 : 10 000 3 : 85 000 3 : 78 000 3 : 33 000
C2	110 000	30	6	β1	1	C2a C2b	1 : 75 000 1 : 35 000
CALEA ALTERNATIVĂ DE ACTIVARE A COMPLEMENTULUI							
B	93 000	200–225	6	β2	1	Ba Bb	1 : 30 000 1 : 63 000
D	25 000	1,5		γ	1	$\overline{D}$	1 : 22 000
P	220 000	10–25	5,2	β	4 : 56 000		

Tabelul nr. 56 (continuare)

Componentul	Greutatea moleculară (dal)	Concentrația serică (μg/l)	Coeficientul de sedimentare	Mobilitatea electroforetică	Numărul polipeptidelor și g. m.	Produșii de activare	Catenele polipeptidice (număr, g.m.)
CALEA COMUNĂ							
C_3	205 000	80	8,7	β1	2 : 120 000 2 : 85 000	C5a C5b	1 : 11 000 2 : 110 000 2 : 85 000
C_6	128 000	75	6	β2	1		
C_7	121 000	55	6	β2	1		
C_8	155 000	80	8	γ1	3 : 77 000 3 : 63 000 3 : 14 000		
C_9	79 000	200	4,5	α	1		
PROTEINE DE REGLARE							
C1—INA	109 000	180	4	α2	1		
C4b-bp	540 000		10,7	β/γ	6—8 : 70 000		
H(1βH)	150 000	500—520	6,4	β	1		
I(C3b—INA)	93 000	25—35	4,5	β	2 : 55 000		
Inactivatorul anafilatoxinei (AI)	310 000	30	9,5	α2	8 : 36 000		

Nomenclatură. Proteinele sistemului complement sînt prezente, în mod normal, în circulaţie sub formă inactivă. Ele sînt desemnate prin litera C (*C*omplement), urmată de un număr (C1, C3, C4 ... C9), care corespunde ordinei în care proteina respectivă intră în reacţie. Face excepţie, de la această regulă, componentul C4 care reacţionează după C1 şi înainte de C2. Această inadvertenţă este datorită faptului că numerotarea produşilor izolaţi şi identificaţi s-a făcut înainte de stabilirea cronologiei intrării lor în reacţie. Alţi componenţi ai sistemului complement sînt desemnaţi prin simboluri (factorul B, D etc.) sau prin denumiri obişnuite (properdina).

Fragmentele rezultate din clivarea enzimatică a anumitor componenţi sînt notate cu litere mici, adăugate la denumirea componentului normal. Astfel, componentul C1 poate fi clivat în trei subunităţi C1q, C1r şi C1s, care, în mod normal, sînt menţinute împreună prin legături necovalente şi prin acţiunea Ca^{2+}.

Enzimele formate în cursul procesului de activare sînt desemnate prin adăugarea unei bare deasupra denumirii componentului inactiv (de exemplu, $\overline{C1s}$, factorul $\overline{B}$ etc.). De asemenea, poate fi notată cu o bară deasupra denumirii produsului inactiv şi starea biologic activă, deşi este lipsită de activitate enzimatică (de exemplu, $\overline{C5b, 6, 7}$).

Sinteza constituenţilor sistemului complement. Relativ puţin cunoscută, sinteza constituenţilor complementului a fost studiată cu ajutorul mai multor tehnici, rezultatele cele mai notabile fiind obţinute cu ajuto-

rul culturilor de celule *in vivo*. S-a demonstrat astfel că cel puțin trei componenți ai complementului uman, C2, C4 și factorul B, sînt codificați de gene structurale localizate pe cromosomul 6, în regiunea CMH-HLA. De asemenea, la șoarece, componentul C4 și concentrația serică a componentului C3 sînt codificate și reglate de gene aparținînd regiunii H-2 a CMH. Proteinele sistemului complement sînt sintetizate de celule cu origini diferite: monocite, macrofage, hepatocite, limfocite și fibroblaste (Harting și Hadding, 1983). Este probabil că cea mai mare parte din componenții serici sînt produși de hepatocite, în timp ce monocitele și macrofagele ar forma componenții necesari propriilor lor activități, în mediul imediat înconjurător. Componentul C1 ar fi sintetizat numai la nivelul epiteliului gastrointestinal și urogenital (Gigli, 1986). Tabelul nr. 57 sintetizează datele referitoare la natura celulelor în care are loc producerea complementului la om.

Tabelul nr. 57

Locul sintezei unor componenți ai complementului în celulele umane (după Peltier, 1978)

	C1	C2	C3	C4	C5
Celule epiteliale din ileon	+	−	−	−	−
Epiteliul vezicului biliare	+	−	−	−	−
Țesut hepatic (hepatocite)	−	+	+	+++	+
Macrofage splenice	+	++	−	+	−
Monocite circulante	−	+	+	−	−

Bazele moleculare ale activității complementului

Constituenții sistemului complement există în sînge în mod normal sub formă de precursori inactivi, formați, în cele mai multe cazuri, prin asocierea unor subunități. Activarea lor se realizează într-o succesiune riguros definită prin clivarea proteolitică limitată, în general, în două fragmente diferite:

1) Fragmentul mai mare are, de regulă, două situsuri de legare: a) un situs enzimatic, activ în clivarea componentului următor din secvență, și b) un al doilea situs prin care fragmentul se leagă de membrana celulară sau de complexul imun inițiator.

În cursul diferitelor etape, fiecare component de acest tip, activează mai multe molecule din componentul următor al secvenței, în așa fel încît se realizează un efect de cascadă enzimatică amplificat. Numai o parte din moleculele activate se leagă de membranele celulare, restul fiind eliberate în lichidul înconjurător, unde sînt rapid degradate sau inactivate specific. Această particularitate are rolul de a limita efectele potențial nocive la antigenul inițiator (spre exemplu, bacteria invadatoare), protejînd de lezare celulele gazdei.

2) Fragmentele mici rezultate din clivare, rămîn în stare liberă și exercită frecvent efecte biologice importante (de exemplu, chemotaxie, creșterea permeabilității vasculare etc.).

Etapa esențială a procesului de activare este clivarea componentului C3, care declanșează o succesiune de reacții ce se termină prin activarea complexului de atac al membranei celulare și liza celulei invadatoare și/sau mărirea adeziunii bacteriilor de receptorii fagocitelor, chemotaxie etc., care amplifică efectele directe ale activării complementului.

Activarea se poate realiza pe două căi : 1) *calea clasică*, cu evoluție rapidă și eficientă, și 2) *calea alternativă*, în mod obișnuit mai lentă și mai puțin eficientă. În funcție de aceasta, proteinele sistemului complement pot fi grupate în trei familii distincte : 1) proteinele specifice căii clasice de activare : C1, C4 și C2 ; 2) proteinele specifice căii alternative : factorii D, B, I, H și properdina ; 3) proteinele complexului de atac al membranei celulare, care, împreună cu componentul C3, sînt comune celor două căi : C5, C6, C7, C8 și C9.

Calea clasică de activare a complementului

Calea clasică evoluează ca o cascadă de reacții enzimatice specifice și interacțiuni proteină – proteină, asociate cu un consum mare de C4, C2 și C3, care duc final la activarea „secvenței de atac", ce determină liza celulară.

Procesul este însoțit de acumularea în plasmă a produșilor de reacție liberi, care au o activitate biologică importantă, ce se adaugă efectelor determinate de reacția principală. În ansamblu, calea clasică de acțiune a complementului reprezintă o modalitate prin care un stimul relativ neînsemnat determină producția unei cantități imense de molecule biologic active. Ea evoluează în următoarele etape succesive :

Etapa de recunoaștere, care constă în fixarea C1 (unitatea de recunoaștere) și activarea ei la $\overline{C1}$, se poate realiza pe două căi :

a) *Calea imunologică* este amorsată de legarea factorului C1 de complexele antigen – anticorp situate pe suprafața unei membrane celulare. Procesul se bazează pe faptul că interacțiunea cu antigenele determină o modificare conformațională a imunoglobulinelor, care „descoperă" situsurile de legare a complementului din structura regiunii Fc a acestora. În cazul IgM, legarea și activarea C1 poate fi efectuată de o singură moleculă, în timp ce în cazul IgG sînt necesare două molecule de Ig, legate foarte apropiat una de alta pe suprafața celulei. Întrucît moleculele de IgG reacționează cu suprafața celulelor în mod cu totul aleatoriu, numai foarte rar două molecule de IgG ajung contigue. De aceea, pentru a realiza condițiile necesare legării C1 proporția moleculelor de IgG per celulă trebuie să fie foarte mare (~ 800 molecule/hematie umană). Diferitele subclase de IgG au și capacitate de legare inegală : IgG3 > IgG1 > IgG2. În sfîrșit, IgG4, ca și IgA, IgD și IgE nu au receptori pentru complement.

b) *Calea neimunologică* implică legarea de endotoxinele bacteriilor Gram-negative, de ADN, de enzime similare tripsinei și de molecule provenite din membrana celulară (proteina A din *Staphylococcus*, proteina C reactivă etc.). Activarea are loc fie prin legarea C1 de aceste molecule, fie prin clivarea lui directă (în cazul enzimelor proteolitice).

Componentul C1, unitatea de recunoaștere a complementului, este prezent în circulație sub forma unui complex macromolecular termolabil alcătuit din trei subunități C1q, C1r2 și C1s2 menținute asociate de prezența ionilor de Ca^{2+}. Disocierea și reasocierea lor se poate face *in vitro* prin îndepărtarea sau adăugarea de Ca^{2+}.

Subunitatea C1q. Complexul C1 este inactiv înainte de a se lega direct de moleculele de Ig prin intermediul subunității C1q, proteină cationică cu g.m. ~ 400 kdal, alcătuită din 6 subunități. După modelul de structură propus de Reid și Porter (1976), C1q are aspectul unui „buchet de lalele" (fig. 220). El este alcătuit din 18 polipeptide, fiecare format din 200 de aminoacizi, legate cîte trei, începînd de la bază și în regiunea corespunzătoare tijei florale, pentru a forma helixuri triple asemănătoare colagenului. Reunite în „Y", cele 6 subunități ale C1q se termină, fiecare, cu un „cap" globular, la extremitatea căruia se găsește situsul prin care se leagă de receptorul corespunzător situat în domeniul C_H2 al regiunii Fc a IgG și, probabil, C_H4 al IgM (Colomb și Porter, 1975). Studiile bazate pe dispersia neutronilor au permis stabilirea structurii componenților individuali ai complexului C1 și a trei modele de asamblare a lor (diferite prin poziția de legare a C1r2 C1s2 (fig. 221). Ele au demontrat că formarea complexului implică modificări conformaționale importante în structura C1r2 și/sau C1s2 (Dwek, 1986).

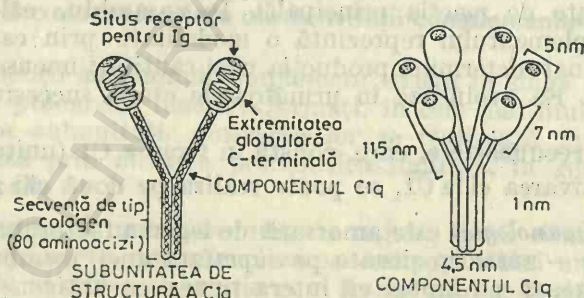


Fig. 220. — Structura componentului C1q. 18 catene peptidice sînt reunite în trei subunități, fiecare formată din șase catene. Fiecare subunitate este formată din două helixuri triple, reunite în Y la o extremitate, și se termină cu un „cap" globulos, la nivelul căruia sînt situați receptorii pentru fixarea imunoglobulinelor (după Roitt, Brostoff și Male, 1985).

Interacțiunea C1q cu receptorul Ig se deosebește de interacțiunea antigen — anticorp. Ea implică intervenția unor combinări și „potriviri" de suprafață („Surface matching"), probabil tipice pentru interacțiunile de recunoaștere dintre proteine. Situsul receptor C1q de pe IgG este o β-catenă, formată predominant din resturi cu sarcini electrice și polare. Recunoașterea lor implică existența unor resturi cu sarcini electrice complementare pe suprafața porțiunii globulare a C1q (fig. 222). Au fost propuse

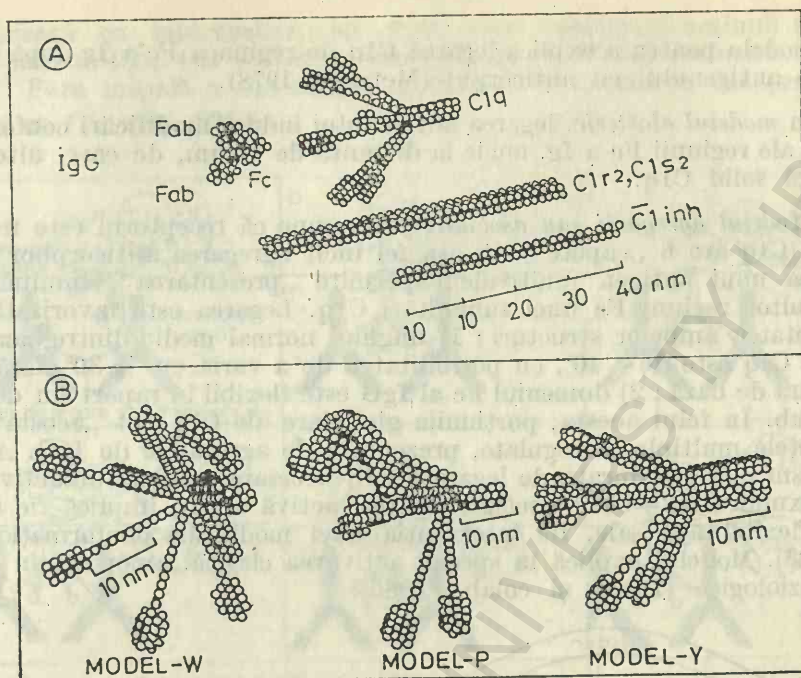


Fig. 221. — Structura moleculară a constituenților complementului. A. Modele de structură pentru IgG (legătura dintre domeniile Fab și Fc este semiarbitrară), C1q, $C1r_2$ $C1s_2$, $\overline{C1}$ inh, construite din sfere cu Ø de 1,19 nm. B. Modele posibile pentru structura complexului C1 alcătuit din C1q și $C1r_2C1s_2$ (după Perkins, 1984).

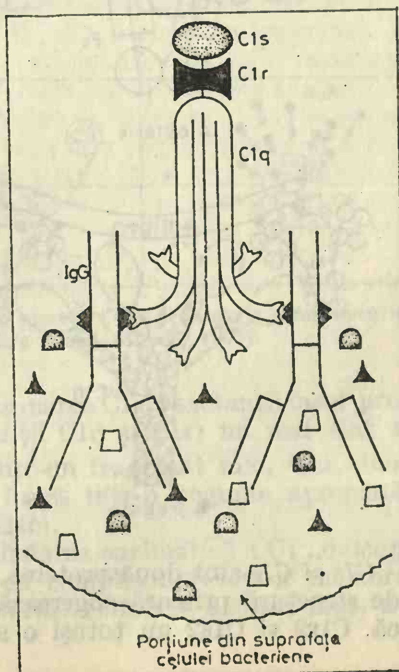


Fig. 222. — Activarea complementului pe calea clasică. Reprezentare schematică a interacțiunii componentului C1q cu situsurile de legare expuse din regiunea Fc a moleculelor de IgG sau IgM, care au reacționat, în prealabil, cu determinanții antigenici de pe suprafața unei celule bacteriene (după Haeney, 1984).

două modele pentru a explica legarea C1q de regiunea Fc a Ig după combinarea antigenului cu anticorpul (Metzger, 1978).

În *modelul alosteric*, legarea antigenului induce modificări conformaționale ale regiunii Fc a Ig, unele la distanță de 10 nm, de care, ulterior, se leagă solid C1q.

Modelul agregării sau asociativ presupune că receptorul este multivalent (C1q are 6 „capete"), în așa fel încît agregarea anticorpilor prin acțiunea unui antigen multivalent permite „prezentarea" simultană a mai multor regiuni Fc unei subunități C1q. Legarea este favorizată de flexibilitatea ambelor structuri : 1) unghiul normal mediu dintre baza și brațele C1q este de ~ 40°, cu posibilitatea de a varia cu ~ 30° față de structura de bază ; 2) domeniul Fc al IgG este flexibil în raport cu domeniile Fab. În felul acesta, porțiunile globulare ale C1q pot „acosta" pe suprafețele multiple, neregulate, prezentate de agregatele de IgG. Acest mecanism mărește durata de legare a C1q necesară pentru autoactivarea complexului C1r2—C1s2 asociat. Starea activă a C1q implică fie alterarea flexibilității sale, fie intervenția unei modificări conformaționale (fig. 223). Modelul explică în special activarea clasică, amorsată în condiții fiziologice (Dwek și colab., 1986).

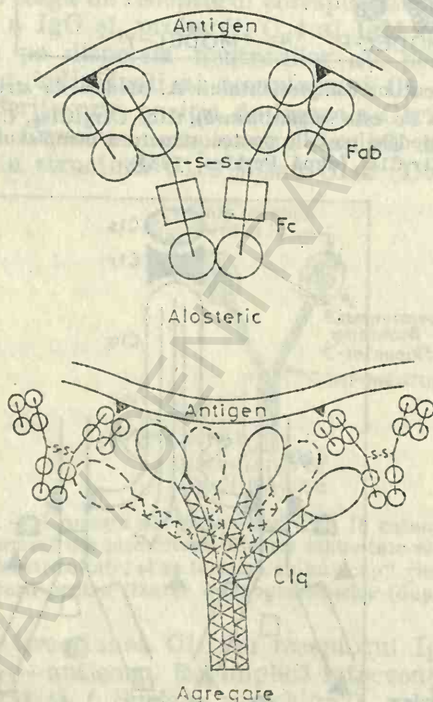


Fig. 223. — Reprezentare schematică a două modele de legare a componentului C1q de regiunea Fc a IgG, după combinarea antigen — anticorp (după Dweck și colab., 1984).

C1r și C1s sînt două proteine, de ~ 83 kdal, chimic înrudite. Omologia de structură primară sugerează apariția lor probabil prin duplicarea genică. C1r2 și C1s2 au totuși o specificitate enzimatică diferită : C1r2

acționează ca intermediar, iar C1s2 este substratul acțiunii sale. În felul acesta, C1q, C1r și C1s se comportă ca un sistem enzimatic „angrenat”. Faza inițială a căii clasice se încheie cu activarea C1s (serinesteraza) ca $\overline{C1s}$ (fig. 224 b).

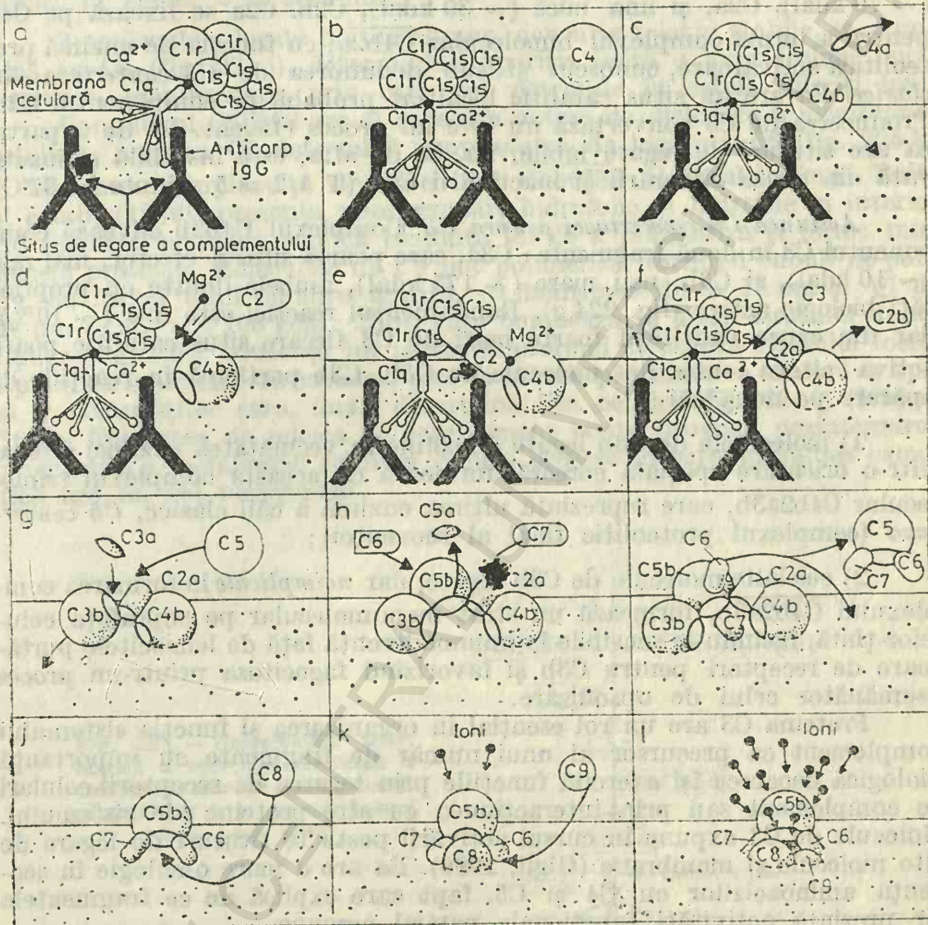


Fig. 224. — Reprezentare schematică a etapelor succesive de activare a complementului la nivelul unei membrane celulare (după Mayer, 1973).

Formarea C3 convertazei. După formarea $\overline{C1s}$, reactanții fazei preliminare (Ig legate de antigene, componenții C1q și C1r) nu mai sînt necesari. $\overline{C1s}$ clivează moleculele de C4 într-un fragment mic, C4a, biologic activ, și altul mare, C4b, care se leagă într-o regiune apropiată pe suprafața celulei invadatoare (fig. 224c).

Legarea este posibilă deoarece scindarea enzimatică a C4 „descoperă” în structura C4b un situs de legare cu complexul receptor membranar. Acest situs are o durată de viață scurtă. Datorită acestui fapt, numai

~ 10% din moleculele C4b se leagă de celule, cele mai multe rămînînd libere în plasmă unde sînt inactivate. După fixarea C4b pe suprafața celulei are loc adsorbția componentului C2 în prezența Mg^{2+} (fig. 224 d). $\overline{C1s}$ este slab proteolitic pentru C2 liber intact, dar foarte activ pe C2 complexat cu C4b (fig. 224 e), pe care îl scindează într-o moleculă mare (~ 70 kdal), C2a, și una mică (~ 30 kdal), C2b. C2a se fixează pe C4b pentru a forma complexul bimolecular $\overline{C4b2a}$, cu funcția de enzimă proteolitică activatoare, cunoscut și sub denumirea de *C3 convertaza căii clasice*. Ea are un situs catalitic localizat probabil pe componentul C2a. Producerea de C3 convertază nu este un proces eficient. Pe de o parte, ea are situsuri de legare labile, iar, pe de alta, este instabilă și inactivată din cauza eliberării și inactivării C2a (T 1/2 = 5 minute la 37°C).

Acțiunea C3 convertazei asupra C3. Complexul C4b2b clivează componentul C3 în două fragmente : C3a, care poartă situsul efector, mai mic (~ 10 kdal), și C3b, mai mare (~ 175 kdal), ambele dotate cu proprietăți biologic active (fig. 224 g). Randamentul reacției este mic (~ 10%), dar din cauza cantității foarte mari de C3 fiecare situs catalitic poate activa cîteva sute de molecule de C3b. $\overline{C3b}$ participă în reacțiile de apărare pe două căi :

1) moleculele de C3b legate de celule în vecinătatea enzimei C4b2a, într-o orientare spațială corectă, formează cu aceasta complexul trimolecular $\overline{C4b2a3b}$, care reprezintă ultima enzimă a căii clasice, *C5 convertaza* (complexul proteolitic final al secvenței) ;

2) celelalte molecule de C3b legate, dar *neimplicate* în formarea complexului $\overline{C4b2a3b}$, formează un strat monomolecular pe suprafața celulelor-țintă, făcîndu-le sensibile la imunoaderență față de leucocitele purtătoare de receptori pentru C3b și favorizînd fagocitoza printr-un proces asemănător celui de opsonizare.

Proteina C3 are un rol esențial în organizarea și funcția sistemului complement ca precursor al unui număr de fragmente cu importanță biologică deoarece își exercită funcțiile prin legarea de receptorii celulari de complement sau prin interacțiunea cu alte proteine ale sistemului. Molecula de C3 expune în cursul activării peste 10 situsuri de legare de alte molecule și membrane (Gigli, 1986). Ea are o mare omologie în secvența aminoacizilor cu C4 și C5, fapt care explică de ce fragmentele lor prezintă activități funcționale parțial comune.

Acțiunea C3b pe C5. C5 convertaza scindează componentul C5 la două fragmente : C5a (g.m. ~ 15 kdal), cu rol de factor chemotactic și eliberator de histamină din celulele în care aceasta este stocată, și C5b (g.m. ~ 170 kdal), un fragment principal, cu rol în formarea complexului de atac al membranei.

Formarea complexului de atac al membranei. Componentul C5b legat de membrana celulară conține o grupare chimică ce îi permite să se lege de C6, evitînd astfel să fie inactivat. Apoi, complexul C5b — C6 reacționează cu C7, pentru a forma complexul trimolecular C5bC6C7

(fig. 224 i), care reprezintă primul stadiu în formarea unităţii de citoliză. El poate acţiona pe două căi :

1) moleculele rămase libere în soluţie îşi pierd situsul de legare şi acţionează numai ca factori chemotactici. În general, inactivarea lor este rapidă (T 1/2 = ~ 30 secunde) ;

2) moleculele legate de membrane, devenite relativ stabile, se combină cu C8 (fig. 224 j), determinînd apariţia lentă a unor leziuni mici, citolitice, membranare, prin care pot pătrunde în celulă diferiţi ioni.

Complexul C5b678 are şi oarecare putere de dislocare a membranei celulare. Legarea C8 determină proprietatea de legare a C9 (fig. 224 k) şi formarea complexului de atac litic $\overline{C5b6789}$ al celulei. După Roitt şi colab. (1986), prezenţa unor grupări hidrofobe şi hidrofile în interiorul aceluiaşi complex explică tendinţa lui de a polimeriza şi forma mici micele proteice. Moleculele de C9 pot polimeriza, formînd tubuli de poli-C9, cu forma unui cilindru amfifil, cu înălţimea de ~ 15 nm şi ∅ de 10 nm (g.m. ~ 1 700 kdal ; 33S), care bombează în afara stratului dublu lipidic (fig. 225). Prezenţa lui perturbă profund structura stratului fosfolipidic membranar. Ca urmare, este facilitată pătrunderea masivă a apei şi a electroliţilor care, final, determină liza celulei (fig. 224 l) (Mayer, 1975). Formarea de micele de complement poate provoca dezintegrarea progresivă a membranei celulare şi prin procese în care presiunea osmotică are un rol neînsemnat.

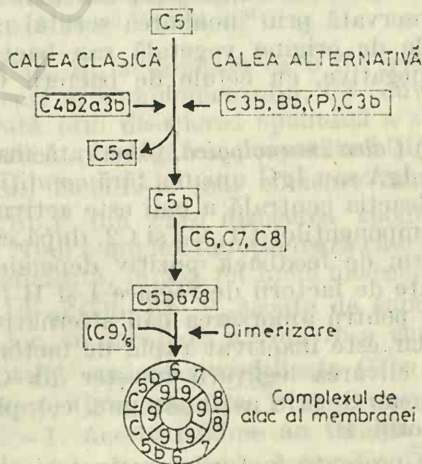


Fig. 225. — Reprezentare schematică a secvenţei terminale a complementului, cu formarea complexului de atac al membranei (după Loos, 1985).

Calea alternativă de activare a complementului

Descoperită de Pillemer (1954), calea alternativă a fost considerată iniţial ca determinată exclusiv de un grup de proteine diferite de cele ale sistemului complement, alcătuind *sistemul properdinic*, implicat în rezistenţa organismului. Ulterior s-a demonstrat că ea are un trunchi comun cu calea clasică, reprezentînd o cale de înlocuire a acesteia, prin scurt-

circuitare, deoarece nu necesită prezența anticorpilor și nici a componenților de activare C1, C4 și C2.

Mecanismul exact și substanțele participante nu sînt perfect cunoscute. Acest fapt, împreună cu sinonimiile de nomenclatură, explică deosebirile în redarea ei de către diferiți autori. Astfel, ea folosește, pe lîngă componentul C3 descris inițial sub denumirea de factor A sau factorul sensibil la hidrazină (FSH), cinci proteine specifice, care au fost izolate și identificate :

1) *factorul* β (proactivatorul C3, β-glicoproteină bogată în glicocol (GBG), β-2-glicoproteina II); termostabil, similar funcțional factorului C 2 din calea clasică, avînd g.m. 95 000 dal;

2) *factorul D* (C3 proactivator-convertaza (C3Paza), β-glicoproteinază bogată în glicocol (GBG), α-globulină cu g.m. 25 000 dal;

3) *properdina*, glicoproteină cu g.m. 220 000 dal;

4) *factorul I* (inactivatorul C3b, factorul KAF, C3b INA), β_1-globulină cu g.m. 88 000 dal) și

5) *factorul H* (β_1H, inactivator accelerator C3b), α-globulină cu g.m. 150 000 dal).

Activarea căii alternative se poate face prin două modalități diferite :

1) *Calea neimunologică*, cea mai frecventă și mai caracteristică, a fost observată prin incubarea serului normal cu polizaharide și lipopolizaharide de origine vegetală sau bacteriană, cu endotoxina bacteriilor Gram-negative, cu celule de bacterii Gram-pozitive și cu zimozan din levuri.

2) *Calea imunologică*, observată mai rar, ar fi inițiată de unele molecule de IgA sau IgG umane, fără condiția de a fi anticorpi specifici.

Reacția centrală a căii este activarea C3, fără ajutorul anticorpilor și al componenților C1, C4 și C2, după care ea funcționează datorită unui mecanism de feedback pozitiv dependent de C3b, ale cărui efecte sînt modulate de factorii de reglare I și H (fig. 226 A, B). Componentul C3b, necesar pentru amorsarea căii alternative, este produs continuu în organism, dar este inactivat rapid de factorii I și H. Formarea lui are loc : 1) prin clivarea legăturii tioester din C3; 2) sub acțiunea unei enzime tisulare sau 3) prin acțiunea unui complex nativ lax format de C3 nativ cu factorul B.

În prezența factorilor activatori ai căii alternative o parte din C3b produs se depune pe suprafața moleculelor sau a substraturilor activatoare, fiind astfel protejat de distrugerea de către factorii I și H. C3b legat de suprafața activatorului interacționează cu factorii B și D, pentru a forma enzima $\overline{\text{C3b, Bb}}$, *convertaza inițială, de amorsare* („priming convertase") capabilă să cliveze în continuare mari cantități de C3 (în mod normal, în absența agenților activatori, convertaza de amorsare se formează foarte lent în organism, asigurînd producerea continuă a unei mici concentrații de C3b în ser). În această etapă se formează ciclul continuu, care, printr-un

mecanism de feedback pozitiv, amplifică stimulul inițial și determină clivarea crescută de C3 (fig. 226); C3b produs sub acțiunea convertazei de amorsare este depus pe suprafața moleculelor activatoare, interacționează cu factorii B și D, și produce și mai multă enzimă $\overline{\text{C3b, Bb}}$.

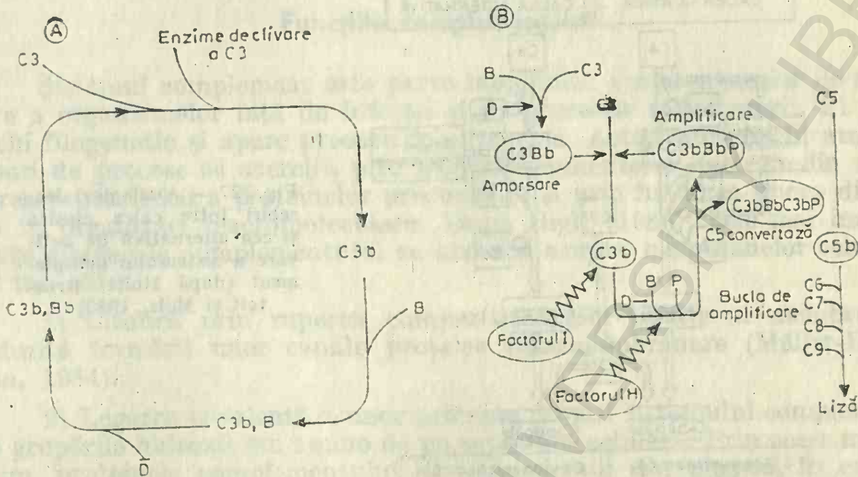


Fig. 226. — Calea alternativă de activare a complementului. A. Reprezentare simplificată a căii de activare a componentului C3. B. Convertaza de amorsare, formată continuu în cantități mici, produce C3b, care participă la formarea convertazei de amplificare, ce produce mai mult C3b. Calea funcționează ca o buclă continuă de feedback pozitiv, ale cărei efecte sînt modulate de factorii I și H (după Haeney, 1984).

Datorită acestui mecanism, $\overline{\text{C3b, Bb}}$ acționează ca o *C3 convertază de amplificare*. Ca și alți constituenți ai complementului, C3 convertaza are tendința de a fi rapid inactivată prin disocierea spontană a subunității Bb. Acest proces este împiedicat de legarea properdinei (P), care stabilizează moleculele de $\overline{\text{C3b, Bb}}$, făcîndu-le mai eficiente funcțional prin formarea complexului $\overline{\text{C3b,Bb,P}}$ din care disocerea spontană a factorului Bb este mult încetinită. Noul complex funcționează ca o *convertază de amplificare stabilă*, foarte eficientă, în așa fel încît moleculele noi de C3b, produse de enzimele $\overline{\text{C3b, Bb}}$ și $\overline{\text{C3b, Bb, P}}$, legate de suprafețele activatorilor, se leagă, la rîndul lor, în imediata apropiere a enzimelor care le-au produs. Se formează astfel enzimele modificate $\overline{\text{C3bn Bb}}$ și $\overline{\text{C3bn Bb, P}}$ ($\overline{\text{C3b, Bb, C3b}}$ și respectiv $\overline{\text{C3b, Bb, C3b, P}}$ după nomenclatura lui Haeney, 1984) în care n > 1. Aceste enzime au funcția de *C5 convertaze* și inițiază secvența de atac, cu formarea complexului $\overline{\text{C5b, C6, C7, C8, C9}}$, care determină liza.

Comparație între calea clasică și cea alternativă de activare a complementului

Din cele prezentate rezultă că ambele căi au ca etapă fundamentală clivarea C3 și producerea de C3 convertaze (C4b2a pentru calea clasică și C3bBb pentru cea alternativă, dar ca răspuns la stimuli diferiți

(fig. 227). C3 convertazele celor două căi pot fixa mai mult C3, pentru a da naştere enzimelor care activează compusul C5 următor al secvenţei, C5 convertaza căii clasice $\overline{\text{C4b2a3b}}$ şi cea a căii alternative, $\overline{\text{C3bBbC3b}}$.

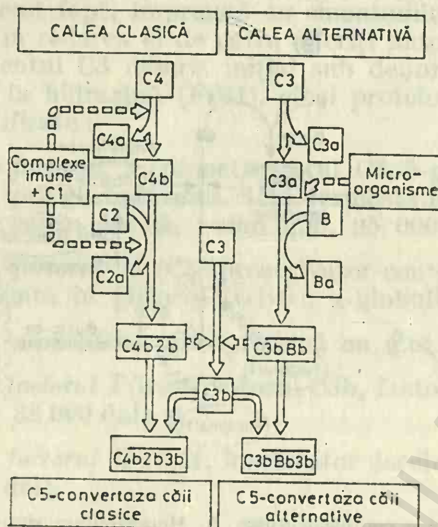


Fig. 227. — Analogii şi deosebiri între calea clasică şi cea alternativă de activare a sistemului complement (după Roitt, Brostoff şi Male, 1985).

Diferenţa fundamentală dintre cele două căi constă în faptul că în calea alternativă C3b formează componentul esenţial al enzimei de clivare a C3, permiţînd căii să amplifice activarea C3 indiferent de modul în care a fost realizată clivarea lui iniţială.

Semnificaţia biologică a căii alternative. Pentru cercetătorii care consideră că activarea acestei căi s-ar face exclusiv pe cale neimunologică (în absenţa anticorpilor specifici), calea alternativă ar reprezenta un mecanism mult mai natural sau mai nespecific de apărare. Ea ar fi importantă, în special, în relaţiile de apărare imediată, în fazele iniţiale ale infecţiilor, cînd anticorpii fixatori de complement nu s-au format în cantităţi suficiente. Se adaugă efectul său protector determinat de reacţiile inflamatorii declanşate de fragmentele biologic active C3a, C3b, C5a, ca şi de complexul C5b,6,7 (Mayer, 1975). Fiind activată uşor de lipopolizaharide şi de endotoxine, calea alternativă este foarte eficientă în rezistenţa faţă de bacteriile Gram-negative intestinale.

Există şi opinia posibilităţii de activare a căii alternative prin mecanisme imunologice. După unii cercetători, în aceste cazuri, activarea n-ar necesita prezenţa anticorpilor specifici agentului infectant, ci ar putea fi determinată de unele imunoglobuline prezente în organism, care ar putea reacţiona, virtual, cu orice suprafaţă celulară bacteriană. Alternativ, activarea ar putea fi efectuată de cantităţi minime de anticorpi specifici. Cum calea clasică necesită pentru activare numai cantităţi mari de IgM şi de IgG se poate conchide că activarea „alternativă" ar reprezenta un mecanism funcţional important, cînd nu există suficienţi anticorpi disponibili pentru a activa calea clasică. Mecanismul de feed-

back pozitiv descris demonstrează, în plus, că una dintre funcţiile căii alternative este de amplificare a căii clasice, prin faptul că prin combinarea C3b cu factorii D, B şi cu properdina se amplifică continuu procesul de clivare a componentului C3.

Funcţiile complementului

Sistemul complement este parte integrantă a mecanismelor de apărare a organismelor faţă de infecţii şi de procesele inflamatorii. El este vechi filogenetic şi apare precoce în ontogenie. Activitatea lui în ambele tipuri de procese se exercită prin efectul fragmentelor derivate din scindarea proteolitică a proteinelor precursoare şi prin fuziunea unora dintre ele în organizări macromoleculare. După Gigli (1986), cele mai importante efecte ale complementului se exercită asupra membranelor celulare pe trei căi:

1) Citoliză prin ruperea compartimentului lipidic al membranei, datorită formării unor canale proteice transmembranare (Müller-Eberhan, 1984).

2) Legarea covalentă a unor proteine proprii sistemului complement de grupările hidroxil sau amino de pe suprafaţa celulară. Prin acest mecanism, proteinele complementului sînt transferate din plasmă, în cursul activării, pe o membrană celulară-ţintă (Tack, 1983).

3) Interacţiunea specifică a fragmentelor proteice ale sistemului cu receptorii specifici (de Bruijin şi Fey, 1985). Mecanismul are importanţă în reglarea răspunsului imun şi în prelucrarea complexelor imune circulante.

Rolul sistemului complement în imunitate

Complementul exercită un rol complex în reacţiile de apărare, în primul rînd, prin declanşarea secvenţei de atac şi liza unor celule străine (bacterii, hematii, trombocite) sau a unor virusuri cu înveliş extern lipoproteic şi, în plus, prin activităţile biologice ale diferiţilor săi componenţi liberi.

Distrugerea litică a celulelor străine. Fixarea proteinelor sistemului complement pe suprafaţa unor bacterii, mediată de anticorpi, induce o serie de modificări ale sarcinii electrice a membranei celulare şi ale mediului membranar, cu modificarea proprietăţilor şi funcţiei membranei şi ale celulei; în unele cazuri, determină leziuni ale membranei şi liza osmotică a celulei.

Celulele rezistente faţă de acţiunea complementului pot datora această proprietate structurii speciale a peretelui sau membranei celulare, lipsei situsurilor de legare pentru componenţii complexului de atac ce acţionează tardiv sau unei capacităţi neobişnuite de a repara rapid leziunile produse. În acest proces, anticorpii specifici îndeplinesc trei funcţii: 1) recunosc invadatorul străin şi „dau alarma" asupra prezenţei acestuia în organism, după ce s-au combinat cu el pentru a forma complexe antigen — anticorp; 2) fixează proteinele complementului pe suprafaţa

celulei invadatoare; 3) activează sistemul complement inducînd secvența reacțiilor enzimatice efectoare.

Complementul acționează de asemenea prin trei funcții: 1) detectează cu ajutorul unității sale de recunoaștere prezența anticorpului legat de antigenul străin și, la rîndul său, se leagă de acesta prin intermediul regiunii Fc a Ig; 2) are situsuri-receptor, care îi permit să se combine, cînd este activat, cu suprafața celulei străine; 3) are capacitatea de inactivare spontană a componenților activați și de limitare a leziunilor la celulele invadatoare, cu menajarea celulelor organismului (Mayer, 1975).

Mecanismul leziunilor membranare induse de complement. Inițial, leziunile induse de sistemul complement au fost puse pe seama efectului Donnan. Acesta materializează un fenomen fizico-chimic, caracteristic membranelor semipermeabile, ai căror pori lasă să treacă ionii și moleculele mici (ca apa și sărurile minerale), dar sînt impermeabile pentru molecule mari (ca proteinele și acizii nucleici). În consecință, celulele respective își măresc dimensiunile pînă la un punct critic, cînd elasticitatea și capacitatea de rezistență a membranei sînt depășite și aceasta este distrusă, iar conținutul celulei eliminat în mediul înconjurător. Pe baza faptului că celulele vii au mecanisme de transport activ și că membranele legate de complement, se comportă asemănător celor semipermeabile, Mayer (1974) a emis ipoteza că sistemul complement ar crea în membranele citoplasmatice orificii, suficient de mari, pentru a permite trecerea liberă a soluțiilor hidrosaline, dar prea mici pentru proteine și acizii nucleici. Ipoteza a fost confirmată de Iles și colab. (1975), care au arătat, prin microscopie electronică a membranelor supuse tehnicii de înghețare — fracturare, prezența unor leziuni care pătrund efectiv stratul dublu lipidic membranar, ca un tunel, și că agregatele care le formează sînt alcătuite din mai multe unități. Leziunile apar sub forma unui inel clar, proeminent la suprafața membranei, care înconjură o regiune centrală, mai închisă la culoare, ca o înfundare a membranei. Inelul clar are proprietățile unei regiuni hidrofobe, iar regiunea centrală ale uneia hidrofile. Leziunile au un diametru uniform, caracteristic fiecărui tip de complement (8,5—9,5 nm pentru complementul de cobai, 10—11 nm pentru cel provenit de la om). S-a demonstrat, de asemenea, că leziunile nu corespund obligatoriu unor orificii ale unui tunel, ci unor agresiuni citolitice produse de sistemul complement. Faptul că fenomenul a fost reprodus prin acțiunea complementului asupra liposomilor demonstrează că agresiunea are loc pe stratul dublu fosfolipidic. Pentru explicarea mecanismului de producere a leziunilor au fost propuse mai multe modele:

Modelul „leaky patch” (modelul peticului permeabil, engl. „leaky” = neetanș) este bazat pe ideea că agresiunea produsă de sistemul complement (respectiv de complexul C5bC3) induce formarea a cîteva mii de molecule de substanță citolitică într-un anumit loc al membranei celulare. Acestea pătrund în membrană, distrug stratul dublu fosfolipidic și creează un „petic permeabil”, respectiv o soluție de continuitate circumscrisă. Modelul presupune producerea continuă a substanțelor citolitice pentru a menține deschis orificiul format. Modelul nu explică dimensiunile perfect uniforme ale leziunilor pe care, normal, substanțele citolitice ar avea ten-

dința să le modifice prin difuzie și nici modul de formare continuă a acestora.

Ipoteza „doughnut” (engl. „doughnut” = prăjitură din aluat îndulcit, ca un colac) consideră că leziunile induse de complement corespund unor orificii stabile create prin formarea unei structuri inelare rigide („doughnut”) în interiorul stratului dublu lipidic, corespunzînd unui canal, ca o pîlnie care leagă interiorul celulei cu exteriorul (Mayer, 1975). Inițial s-a considerat că ar fi tapetat la interior de proteine membranare. Deoarece fenomenul se produce și în liposomi, care nu conțin proteine, s-a ajuns la concluzia că peretele canalului este format prin aranjarea inelară a celor cinci constituenți cu acțiune tardivă ai complementului C5b, C6, C7, C8 și C9. Ei s-ar lega de stratul dublu lipidic pentru a forma un canal, ca o pîlnie care străbate membrana. Regiunea centrală goală a structurii reprezintă leziunea prin care apa și ionii pătrund în celulă pînă cînd aceasta explodează (fig. 228).

Studiile cinetice și statistice pledează pentru ideea că fixarea unui singur complex C5bC9 pe suprafața membranei eritrocitare poate produce o „leziune” membranară suficientă pentru a declanșa liza celulei („One hit reaction hypothesis”). Cu toate acestea, este probabil că în condiții fiziologice, în special datorită caracterului enzimatic al anumitor etape ale reacțiilor, liza hematiilor ar rezulta dintr-o multitudine de leziuni, care se produc simultan pe membrana lor („Multihit reaction”) (Mayer, 1975).

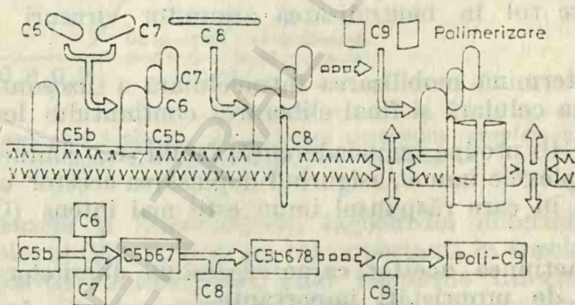


Fig. 228. — Reprezentare schematică a căilor de formare a complexului de atac al membranei celulare. Complexul C5b678 are o anumită putere de dislocare a membranei și de a antrena polimerizarea C9, care formează tubuli ce traversează membrana. Tubulii asociați cu C5b678 formează complexul de atac al membranei (după Roitt, Brostoff și Male, 1985).

Alte funcții imunitare ale complementului

Proprietățile biologice ale complementului au un rol major în numeroase procese inflamatorii și în apărare. Unele depind direct de acțiunea fragmentelor eliberate prin clivarea anumitor compuși ai sistemului, în timp ce altele depind fie de anumite proprietăți (spre exemplu, enzimatice) relevate de modificarea structurală a unor componenți, fie de formarea unor complexe multimoleculare prin legarea mai multor componenți

(fig. 229). Pînă în prezent au fost descrise numeroase proprietăți ale fragmentelor și complexelor de componenți :

1) C1 are rol în neutralizarea virusurilor ;

2) C1q inițiază liza virusurilor și precipitarea complexelor imune ;

3) C3a și C5a au rol de anafilatoxine, măresc permeabilitatea vasculară și contracția mușchilor netezi și au rol chimiotactic ;

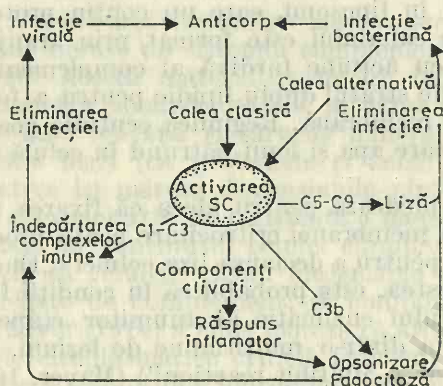


Fig. 229. — Reprezentare schematică a mecanismelor de eliminare a virusurilor și microorganismelor invadatoare sub acțiunea sistemului complement. Rolul diferiților constituenți a fost stabilit studiindu-se consecințele lipsei sau diminuării cantității lor într-o serie de boli genetice (după Haeney, 1984).

4) C4b are rol în neutralizarea anumitor virusuri (Herpesvirus, Oncornavirus) ;

5) C5a determină mobilizarea intracelulară a lizosomilor, fuziunea lor cu membrana celulară și final eliberarea conținutului lor la exterior ;

6) C3b și C4b produc imunoaderență, facilitează contactele cu fagocitele și cu complexele imune, asigurînd deplasarea acestor complexe spre anumite regiuni în care răspunsul imun este mai intens (Cooper, 1984) (fig. 230).

Din interacțiunea acestor caracteristici ale diferitelor componente rezultă o serie de proprietăți importante :

1) *Imunoaderența* este conferită de fragmentul C3b. Depus ca o peliculă moleculară pe suprafața celulelor-țintă (bacterii etc.), permite interacțiunea cu receptorii specifici de pe suprafața fagocitelor (macrofage, neutrofile, eozinofile) a hematiilor primatelor, trombocitelor și limfocitelor B, la care poate funcționa și ca receptor pentru virusul Epstein-Barr. Particulele acoperite cu C3b, indiferent de natura lor, aderă ferm de celulele fagocitare printr-un mecanism similar opsonizării. Macrofagele activate, avînd o densitate mai mare de receptori de C3b decît monocitele, au o capacitate de imunoaderență și de fagocitoză mai mare. Întrucît cele mai multe celule-țintă sînt lipsite de receptori pentru IgM este probabil că fixarea C3b pe suprafața lor reprezintă elementul opsonizant cu rol critic în cursul fazei precoce a răspunsului imun primar. Ulterior, după apariția IgG care au o aviditate mai mare, efectul opsonizant al C3b este mai puțin important, deoarece legarea IgG de receptorul Fc este,

prin ea însăşi, suficientă pentru a induce fagocitoza. Imunoaderenţa măreşte, în acelaşi timp, activitatea citotoxică dependentă de IgG.

Importanţa imunoaderenţei este demonstrată de deficitul de C3 după distrugerea lui selectivă în serul animalelor de laborator, care devin mai sensibile faţă de infecţiile produse de bacterii cu virulenţă mică. În mod asemănător, oamenii cu deficit de C3 fac mai frecvent infecţii cu bacterii patogene.

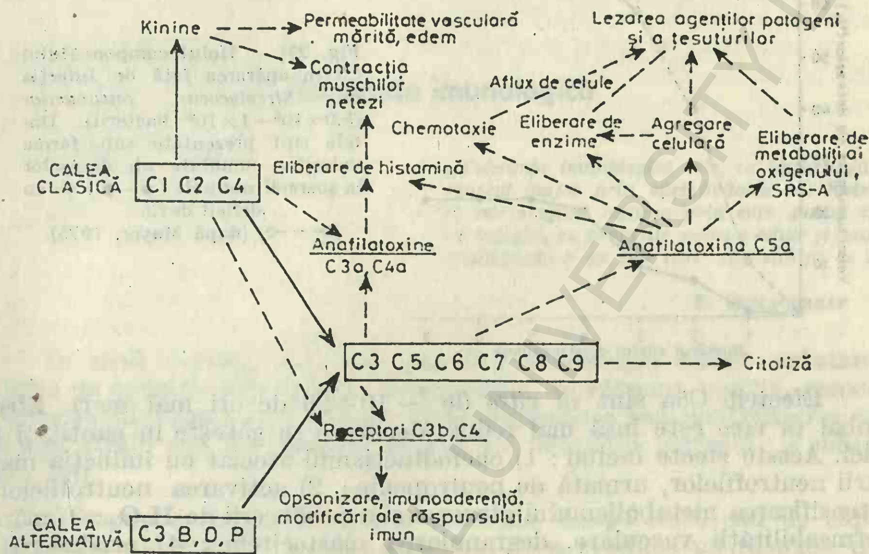


Fig. 230. — Consecinţe biologice ale activării sistemului complement: P — properdina; B — factorul B; D — factorul D.

2) *Chemotaxia* şi intensificarea fagocitozei determinate de C3b, C5a şi de complexul C5b, 6, 7 au un rol important, în special, în faza premergătoare apariţiei anticorpilor, cînd bacteriile infectante activează calea alternativă. Ele determină un aflux masiv de neutrofile, activează fagocitoza bacteriilor, eliberarea de hidrolaze şi, în general, măresc rapiditatea şi intensitatea răspunsului imun. Animalele cu deficit imun de C5 fac, în general, infecţii letale după injectarea intraperitoneală a pneumococilor cu virulenţa medie (fig. 231) (Mayer, 1975).

3) *Acţiunea anafilatoxinelor*. Anafilatoxinele sînt peptide mici, derivate din C3, C4 şi C5, eliberate în cursul activării sistemului complement. Ele funcţionează ca mediatori puternici ai proceselor inflamatorii, comportîndu-se ca molecule-mesager, similare hormonilor, care se leagă cu mare afinitate de receptorii de suprafaţă specifici pe numeroase celule (granulocite, monocite, macrofage, celule musculare netede, unele limfocite T) (Hugli, 1984). Cei mai studiaţi sînt componenţii C3a şi C5a, caracterizaţi prin prezenţa unei molecule cu origine carboxiterminală, răspunzătoare de proprietăţile lor „spasmogene".

Efectele C3a, determinate de un octopeptid carboxiterminal, care include arginina, sînt caracterizate prin contracția mușchilor netezi din diferitele organe (ileon și uter la cobai), modificări ale celulelor endoteliale din venulele postcapilare etc. Unele efecte vasculare sînt indirecte, fiind consecutive eliberării de histamină din mastocite.

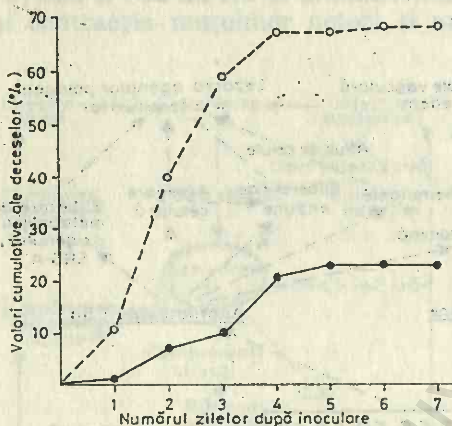


Fig. 231. — Rolul componentului C5 în apărarea față de infecția cu *Streptococus pneumoniae* ($5,0 \times 10^5 - 1 \times 10^8$ bacterii). Datele sînt prezentate sub forma valorilor cumulate ale deceselor la șoarecii normali (●—●) și cu deficit de C5 (○– – –○) (după Mayer, 1975).

Efectele C5a sînt *in vitro* de ~ 10–20 de ori mai mari. Efectul global *in vivo* este însă mai redus, deoarece se găsește în cantități mai mici. Aceste efecte includ : 1) chemotactismul asociat cu inducția marginării neutrofilelor, urmată de neutropenie ; 2) activarea neutrofilelor cu intensificarea metabolismului glucozei și a producerii de H_2O_2 ; 3) mărirea permeabilității vasculare, degranularea mastocitelor ; 4) producerea de leucotriene, în special LTB4, care prelungesc durata permeabilității vasculare mărite ; 5) contracția mușchilor netezi. Aceste proprietăți persistă în formă mai puțin manifestă și în peptidul lipsit de arginină.

Acțiunea combinată a fragmentelor C3a și C5a eliberează amine vasoactive din celulele care le conțin (leucocite, mastocite, trombocite etc.), care măresc permeabilitatea capilarelor, determinînd aflux leucocitar în țesuturile infectate, eliberarea de enzime lizosomale etc. În sfîrșit, unele fragmente pot fi implicate în producerea unor reacții de tipul anafilaxiei, în geneza unor boli cu complexe imune, ca și în eliminarea complexelor imune.

Reglarea activității sistemului complement

Activitatea sistemului complement este reglată prin mecanisme complexe, care includ : 1) acțiunea lor limitată, legată de consumul diferiților componenți, uneori pînă la epuizare, în cursul activării căilor clasice și/sau alternative ; 2) inactivarea spontană, rapidă, a situsurilor de legare active ; 3) acțiunea inhibitorilor specifici. Spre exemplu, „inhibitorul C1" blochează activitatea $\overline{C1}$, fără să influențeze prezența și concentrația C1 nativ. Factorii XI și XII ai coagulării controlează activitatea C1 față de C4 și C2, iar factorul I controlează activitatea de amplificare a căii alternative.

Mecanismele de reglare vizează suprimarea potențialului autodistructiv, prin acțiunea complementului asupra celulelor proprii organismului, și limitarea activității lui asupra antigenelor străine. Mecanismele de control ale activității complementului nu funcționează întotdeauna perfect. De aceea, în unele cazuri, complementul poate leza celulele proprii organismului-gazdă, determinînd o dezorganizare a reacțiilor normale ale acestuia și declanșarea unor fenomene de hipersensibilitate și alergie.

Toleranța imunologică

„Toleranța imunologică este, ca importanță, un concept major prin specificitatea sa. Existența ei este singura rațiune prin care putem exista ca indivizi, cu propriile noastre celule și țesuturi, respingîndu-le pe cele care sînt străine de noi."

B. Benacerraf

În mod normal, sistemul imunitar deosebește corect substanțele străine de constituenții proprii, determinînd un răspuns pozitiv, respectiv o stare de imunitate, care asigură, final, eliminarea sau neutralizarea antigenului străin sau un răspuns negativ de toleranță perfectă a substanțelor self.

Toleranța imunologică este o stare de incapacitate sau de capacitate diminuată specific a unui organism de a produce un răspuns imun mediat umoral sau/și celular, indusă de o expunere anterioară la un anumit antigen. Ea este asociată cu păstrarea nealterată a reactivității față de toate antigenele care nu dau reacții încrucișate cu antigenul inductor. Este cunoscută și sub denumirea de *areactivitate imunologică* („Immunological unresponsiveness"), atribuită inițial unui anumit tip de răspuns imun.

Definiția este pur operațională, deoarece nu implică intervenția unui anumit mecanism declanșator particular. Ea exclude *de plano* incapacitatea controlată genetic de a produce un răspuns imun, pe cea legată de deficitele imunitare, precum și pe cea decurgînd din neimunogenitatea unei anumite substanțe sau unui constituent. Dovadă este faptul că dacă organismul nu este supus unui proces de inducție a toleranței, răspunsul este normal. Inducția și demonstrarea existenței unei stări de toleranță imunologică necesită două expuneri la același antigen, în condiții adecvate fiecăreia dintre ele : 1) o expunere inițială inductoare; 2) o expunere secundară, de evidențiere, în cursul căreia antigenul este administrat în condiții corespunzătoare pentru declanșarea unui răspuns imun.

Existența toleranței imunologice a fost recunoscută prima dată de Ehrlich (1900), care a acordat un rol important discriminării self — nonself. El a demonstrat că injectarea hematiilor de oaie la capre determină producerea de anticorpi care lizează hematiile de oaie. Fenomenul poate fi

reprodus și cu sînge de la alte capre, dar niciodată cu propriile hematii extrase din organism și reinjectate. Ehrlich a denumit fenomenul bazat pe incapacitatea organismelor de a produce anticorpi față de propriile celule „horror autotoxicus". Dacă ar putea produce anticorpi ar leza grav propriile celule și țesuturi.

Prima demonstrație a toleranței induse a fost făcută de Wells și Osborne (1911), care au evidențiat diminuarea capacității de sensibilizare a cobailor față de șocul anafilactic, prin administrarea orală a antigenului respectiv în cantități mari.

În anul 1945, Owen a descris o formă particulară foarte rară de toleranță indusă la viței. Gemenii neidentici (dizigotici) avînd o placentă comună (engl. „Freemartins" ; termen cu origine necunoscută însemnînd hermafrodit, descendent al taurinelor cu organizare imperfectă de tip femel) prezintă o circulație sanguină comună, datorită anastomozelor vasculare. Dacă nu ar fi legați prin aceeași circulație, la naștere hematiile fiecăruia ar fi antigenice pentru celălalt și prin recunoașterea antigenelor de histocompatibilitate ar stimula producerea de anticorpi, activarea celulelor T și B și distrugerea lor. În situația descrisă însă, expunerea fiecărui animal în cursul vieții fetale la celulele celuilalt determină toleranță față de celulele străine. Organismele evoluează ca himere hematopoetice stabile, fiecare avînd în sînge celule aparținînd celor două tipuri genetice diferite, care sînt însă perfect tolerate. Pe baza acestei observații, Burnet și Fenner (1949) exprimă ideea necesității unei discriminări self — nonself, ca o proprietate „învățată" în ontogenie. După opinia lor, verificată ulterior experimental, substanțele antigenice care ajung în contact cu celulele limfoide în cursul dezvoltării acestora, în faza de imaturitate imunologică (prenatală sau imediat postnatală), pot determina anularea răspunsului imun față de antigenul respectiv, chiar cînd animalul este imunologic competent. Chiar celulele și substanțele străine introduse în organism în perioadele respective pot „înșela" organismul, făcîndu-l să le trateze ca proprii în cursul vieții.

Medawar (1950) a demonstrat că gemenii de tipul himerelor eritrocitare sînt mutual toleranți la grefe de piele, indiferent de sexul lor sau de culoarea pielii. Ulterior, Medawar împreună cu Billingham și Brent (1953) au creat un himerism analog la șoarece, injectînd șoarecii CBA *in utero* sau imediat postnatal cu celule splenice alogenice vii, provenind de la o linie genetic diferită. Cînd șoarecii CBA au devenit adulți s-a testat capacitatea lor de a păstra grefele de piele provenite de la animalele donatoare de celule splenice. Pielea transplantată a supraviețuit mai mult sau mai puțin indefinit (în mod normal, șoarecele CBA (de culoare brună) respinge grefele de piele de la șoarecele A (alb) în 10—14 zile). Toleranța astfel indusă a fost atribuită distrugerii limfocitelor reactive în organismul șoarecilor nou-născuți, în urma contactului cu antigenul străin, provenit de la animalele donatoare. Fenomenul a fost confirmat de Hašek (1955), care a provocat o stare de areactivitate specifică la embrionii de găină parabiotici (prin intermediul unor anastomoze ale membranelor chorioalantoidiene bogat vascularizate). După ecloziune, nici unul din puii de găină testați nu au respins grefele de piele și nu au produs anticorpi față de țesuturile celuilalt.

Tipurile de toleranță imunitară

Au fost descrise trei tipuri de areactivitate imunitară: 1) *toleranța naturală*; 2) *toleranța indusă artificial*; 3) *toleranța indusă patologic* (tabelul nr. 58).

Tabelul nr. 58

Tipurile de areactivitate imunitară

Tipul	Mecanismul inducției
Toleranța naturală (areactivitatea imunologică naturală)	Toleranță indusă în cursul ontogeniei prin procesul de „educație" a limfocitelor, în urma contactului cu antigenele markeri de self (CMH), în timus
Toleranța indusă artificial	Paralizia indusă de antigen, utilizarea de agenți imunosupresori (ser antilimfocitar, ser antitimocite, ser anti-Ig, ser anti-Thy-1), exces de anticorpi specifici pentru antigen, droguri citotoxice, hormoni corticosteroizi, iradiere subletală, ablația chirurgicală a unor organe limfoide
Imunosupresia indusă patologic	Boli asociate cu imunodeficiențe, unele infecții virale, bacteriene, fungice, neoplazii

Toleranța naturală („Natural immunological tolerance" sau „Self-tolerance") apare în cursul dezvoltării ontogenetice (intrauterin) și se menține în tot cursul vieții. Datorită ei, organismele nu produc răspuns imun față de antigenele proprii, indiferent dacă sînt solubile sau tisulare. Selftoleranța apare inițial în timus, unde celulele T își dezvoltă competența. Limfocitele timice manifestă toleranță la naștere, înainte ca aceasta să se manifeste în celulele periferice. Un rol esențial în achiziția toleranței la self a celulelor T în curs de dezvoltare îl au celulele dendritice din timus (vezi cap. *Limfocitele T*). În timp ce timusul are un rol esențial în „educația" limfocitelor T și în inducția toleranței, menținerea acesteia depinde, cel puțin parțial, de un mecanism periferic (Cruse și Lewis, 1987). În unele cazuri, eliminarea limfocitelor efectoare cu funcții antiself poate fi atribuită activării intratimice, iar în altele, prezenței limfocitelor periferice cu rol de reglare.

Toleranța imunitară la self nu afectează ansamblul constituenților proprii. Pentru a fi recunoscute ca self, diferitele substanțe trebuie să fie accesibile celulelor sistemului imunitar, în cursul dezvoltării prenatale. Incapacitatea de a produce în mod normal un răspuns imun față de unele proteine proprii (din testicul, cristalin, creier etc.) nu este determinată de toleranță, ci de segregarea („sechestrarea") acestora în anumite situsuri avasculare. Ca urmare, ele nu vin în contact cu celulele sistemului imunitar în timpul fazei timpurii critice de creștere embrionară, cînd limfocitele sînt mai sensibile față de inducerea toleranței. Ori de cîte ori barierele anatomice sînt rupte, antigenele „sechestrate" declanșează reacții autoimune. Un astfel de antigen, care nu apare decît tardiv în cursul dezvoltării, este cel prezent pe celulele spermatice mature. Ceva mai mult, acestea părăsesc organismul, în mod normal, prin canalele sper-

matice, deopotrivă „sechestrate" de o barieră anatomică, ce le împiedică să pătrundă în sînge. În cazul în care antigenele spermatice sînt „forțate" să treacă în organism (de exemplu, după intervențiile chirurgicale de tipul vasotomiei, care blochează canalele spermatice), ele determină producerea de anticorpi și apariția de reacții autoimune.

Deși acest fenomen este conceptual logic și fundamental pentru menținerea stării normale a țesuturilor și a organismelor există, și în acest domeniu, unele date contradictorii. Ele reflectă marea complexitate a fenomenului și necesitatea abordării mai nuanțate. Astfel, tiroglobulina, deși considerată ca făcînd parte din categoria antigenelor „sechestrate", este detectată și în sîngele periferic al omului normal perfect sănătos, ca și limfocitele B specifice ei. Această constatare sugerează existența, cel puțin în anumite cazuri, a unor forme alternative active în restrîngerea reacțiilor potențial dăunătoare. De altfel, Cruse și Lewis (1987) semnalează prezența certă a unor celule autoagresive în sîngele periferic al omului normal. Ei consideră că în timp ce autoreactivitatea crescută sau necontrolată poate declanșa agresiuni distrugătoare pentru celulele gazdei, un nivel scăzut de autoreactivitate autoimună poate avea un efect benefic pentru organism. În felul acesta, autoreactivitatea foarte redusă, riguros controlată, ar fi o funcție aparent normală a sistemului imunitar.

Toleranța față de constituenții self este menținută, în mod normal, toată durata vieții unui organism. Ea poate fi totuși întreruptă experimental, prin diferite practici, ca, de exemplu, iradierea subletală asociată cu transplantul de măduva oaselor normală provenită de la animale singenice sau prin intervenții imunologice de tipul reacțiilor grefă contra gazdă (Cruse și Lewis, 1987). Bolile autoimune oferă un model natural tipic pentru suprimarea toleranței la self.

Toleranța indusă sau dobîndită („Acquired immunological tolerance") este produsă prin acțiunea unor antigene exogene asupra diferitelor mecanisme ale sistemului imunitar. Raportul dintre toleranța naturală față de antigene endogene self și cea indusă nu este încă lămurit. După Siskind (1984) este probabil că unele mecanisme active în toleranța indusă sînt mai strîns corelate cu mecanismele care reglează răspunsul imun decît cu cele active în toleranța la self. Starea de toleranță imunologică poate fi determinată fie prin „reducerea la tăcere" a tuturor limfocitelor reactive la self (toleranță centrală), fie prin inhibarea efectelor lor (toleranța periferică).

Toleranța centrală corespunde situației în care administrarea antigenului nu determină producerea de anticorpi, deoarece limfocitele B implicate în răspunsul corespunzător au fost toate inactivate (anergie clonală). Un exemplu tipic este cel al toleranței dobîndite în cursul dezvoltării ontogenetice, cînd celulele B imature trec printr-o fază în cursul căreia contactul cu antigenele self sau străine induce toleranța în loc de răspuns imun. Celula primește un semnal „tolerizant", care, după unii autori, determină inactivarea funcțională, fără moarte celulară. Deoarece celulele B au un turnover rapid și, ca urmare, sînt produse permanent în tot cursul vieții, această formă de producere a toleranței este un proces activ și continuu.

Toleranţa periferică este determinată de intervenţia unor mecanisme complexe, care au rolul de a preveni un răspuns excesiv, în urma contactului cu un antigen. În cursul toleranţei periferice, limfocitele reactive la antigen sînt inhibate continuu şi activ de interacţiunile cu celulele T_S (care pot acţiona antagonist cu limfocitele T_H sau direct cu celulele B), cu anticorpii antiidiotip sau cu complexele imune.

Toleranţa completă corespunde incapacităţii globale de a manifesta diferitele forme ale răspunsului imun (sinteza anticorpilor, hipersensibilitatea de tip întîrziat etc.).

Toleranţa parţială corespunde situaţiei în care sînt afectate intensitatea sau anumite manifestări ale răspunsului imun faţă de un antigen, în timp ce altele rămîn normale. Ea poate avea manifestări diferite, ca de exemplu: 1) diminuarea semnificativă (nu suprimarea) a răspunsului specific imun, fie pentru toate izotipurile de Ig, ca şi pentru hipersensibilitatea de tip întîrziat, fie preferenţial pentru o anumită clasă de Ig sau pentru un anumit tip de hipersensibilitate.

O formă particulară, numită toleranţa „disociată" („Split tolerance"; engl. „Split" = divizat, clivat, separat), descrisă iniţial sub denumirea de *imunodeviere*, poate evolua cu afectarea celulelor T_{DH} şi menţinerea reactivităţii normale a celulelor T_H şi B. Fenomenul poate corespunde menţinerii unei anticorpogeneze normale, în timp ce capacitatea de răspuns de tipul hipersensibilităţii întîrziate este abolită.

O altă formă corespunde toleranţei induse selectiv faţă de anumiţi epitopi de pe suprafaţa unei molecule sau celule, nu însă faţă de toţi cei prezenţi pe acestea. Toleranţa parţială poate evolua şi sub forma pierderii capacităţii de a produce anticorpi cu o mare afinitate şi limitarea răspunsului imun la producerea de anticorpi cu afinitate mică.

În unele cazuri, în sfîrşit, toleranţa este influenţată de specificitatea tisulară. Astfel, un animal A poate fi făcut tolerant faţă de antigenele tisulare ale altui animal B, nu însă şi faţă de antigenele din piele. Fenomenul este determinat de faptul că aloantigenele recunoscute ca străine pe celulele din piele nu sînt exprimate pe celulele hematopoetice şi tisulare, faţă de care animalul B a fost făcut tolerant.

Toleranţa indusă de stări patologice este consecutivă unor maladii care alterează răspunsul imun normal. Ea a fost semnalată în cazul unor infecţii cronice (ca tuberculoza, lepra, sifilisul), care pot diminua sau suprima răspunsul imun, fie în mod specific, fie nespecific (Webb şi Winkelstein, 1984). Un efect similar au bolile proliferative ale celulelor imunocompetente (leucemie, mielom multiplu, limfom etc.).

Mecanismul diminuării răspunsului imun sau chiar al areactivităţii nu este bine cunoscut. El are la bază interacţiunea specifică dintre constituenţii sistemului imunitar şi modificările asociate cu stările patologice enumerate. În unele cazuri, agentul invadant poate produce anumite substanţe care suprimă răspunsul gazdei sau blocarea mecanismelor normale ce determină rezistenţa organismului.

Factorii care influenţează inducţia toleranţei

Numeroase observaţii experimentale au arătat că diferitele condiţii care inhibă răspunsul imun, probabil prin scăderea numărului de celule T_H disponibile, favorizează inducţia toleranţei imunitare.

Astfel, *iradierea limfoidă totală* face animalele adulte mai susceptibile la toleranţă. Practicată cu doze fracţionate (asigurînd protecţia cu ecrane de plumb a măduvei oaselor, plămînilor şi celorlalte organe nelimfoide vitale), se pot administra doze globale mari (4 000 rads), fără efecte severe colaterale. Se creează în felul acesta, pentru o perioadă de timp, o reactivitate asemănătoare celei a nou-născutului, în cursul căreia poate fi indusă o toleranţă imunitară de lungă durată faţă de o gamă largă de antigene şi se pot produce himere medulare alogenice. Ea încetează după ce organele limfoide secundare sînt recolonizate de descendenţii celulelor-stem medulare.

Drogurile citotoxice (ciclofosfamida, acriflavina, ametopterina, 6-mercaptopurina şi derivatul ei azotioprina ş.a.), ca şi serul antilimfocitar sau drenajul canalului toracic exercită, cu anumite particularităţi individuale, un efect favorizant net asupra inducţiei toleranţei. Ciclofosfamida acţionează deopotrivă asupra celulelor T şi B. Administrată unui animal, imediat înainte de imunizarea cu un antigen T-independent, produce toleranţă faţă de el. Ar acţiona împiedicînd regenerarea receptorilor imunoglobulinici de pe suprafaţa celulelor B, care s-ar comporta asemănător celulelor de nou-născut.

După Siskind (1984), mecanismul de acţiune al acestor factori favorizanţi ar fi mult mai complex şi, cel puţin în unele cazuri, ar putea implica:

1) distrugerea limfocitelor mature şi devierea spre limfocite imature, mai sensibile la toleranţa imunitară;

2) modificarea raportului T_H/T_S, în favoarea celor din urmă;

3) omorîrea selectivă a celulelor stimulate de contactul cu antigenul pătruns în organism;

4) împiedicarea imunizării printr-un mecanism încă nedepistat.

Date recente pledează pentru ipoteza că multe tratamente favorizante ale inducţiei interferă cu producţia de IL-2, mediator limfocitar a cărui prezenţă este esenţială pentru un răspuns imun eficient. În sprijinul acestei opinii au fost aduse mai multe argumente (Male, Champion şi Cooke, 1987):

1) drogurile care blochează sau inhibă producerea de IL-2 favorizează inducţia toleranţei;

2) administrarea IL-2 *in vivo* blochează dezvoltarea toleranţei faţă de aloantigene, haptene cuplate pe celule, precum şi formarea de celule T_H specifice pentru antigenul respectiv;

3) diferiţii stimuli care declanşează sinteza de IL-2 blochează inducţia toleranţei;

4) blocarea funcţională sau deleţia *in vivo* a celulelor producătoare de IL-2 cu ser imun anti-L3T4 la şoarece permit inducţia toleranţei faţă de diferite antigene;

5) celulele splenice provenite de la animalele nou-născute (foarte susceptibile la toleranţă) nu produc IL-2 după stimularea cu ConA.

Proprietăţile antigenelor. Natura şi proprietăţile antigenelor pot influenţa inducţia stării de toleranţă pe mai multe căi.

Imunogenitatea intrinsecă. Diferitele substanţe antigenice au proprietăţi tolerogene foarte variabile. Astfel, s-a constatat că, în general, substanţele slab imunogene pentru şoarece, ca albumina serică bovină (ASB), sînt înalt tolerogene şi invers, cele foarte imunogene (lizozim, hemocianină, KHL etc.) sînt slab tolerogene.

Starea fizică a antigenului. Cercetările lui Dresser (1962, 1965) au demonstrat că starea fizică a antigenelor are un rol critic în determinarea proprietăţii lor tolerogene şi că, în funcţie de ea, unele antigene se pot comporta fie ca imunogene, fie ca tolerogene. El a demonstrat că fracţiunea solubilă, dispersată, monomoleculară a gamaglobulinelor heterogene, obţinută prin ultracentrifugare (30 min/30 000 g), inoculată în doze mici (10—200 μg), induce o stare de toleranţă, în timp ce fracţiunea agregată, din sediment, determină un răspuns imun. Fenomenul a fost confirmat experimental şi pentru alte antigene.

S-a constatat, totodată, că efectul de separare şi fracţionare a proteinelor heterologe se realizează şi *in vivo*, datorită procesului de filtrare biologică realizat de fagocite. Constituenţii rapid fagocitaţi, corespunzînd fracţiunii agregate din experimentele lui Dresser, sînt imunogeni, în timp ce fracţiunea solubilă, greu sau chiar nefagocitabilă, are efect tolerogen. S-a demonstrat, spre exemplu, că suspensia salină de BCG este în mod normal imunogenă pentru iepure şi şoarece, dacă este utilizată ca atare sau asociată cu un adjuvant. Dacă este debarasată de „agregatele" celulare prin ultracentrifugare şi prezentată exclusiv sub formă de celule izolate („monomere" de BCG), devine tolerogenă.

Rezultate care pledează în acelaşi sens au fost obţinute de Frei, Thorbecke şi Benacerraf (1977), care au demonstrat efectul de „filtru biologic" al macrofagelor. Ei au injectat intravenos la iepure ASB şi au reizolat-o după două zile. Fracţiunea izolată nu mai era imunogenă, dar păstra capacitatea de a induce toleranţă. Experienţa demonstrează că ASB rămasă în circulaţie a fost „filtrată" prin macrofage, care au îndepărtat toate fracţiunile imunogene, lăsînd nemodificate formele moleculare nefagocitabile, care au efect tolerogen. Dovadă este faptul că modificarea stării fizice a acestora, prin agregare la cald sau prin încorporare în adjuvanţi, le converteşte la imunogeni puternici. Experienţele sugerează că, în general, antigenele sînt mai tolerogene dacă reacţionează direct cu limfocitele şi mai imunogene dacă au fost prelucrate de macrofage înainte de a fi prezentate limfocitelor.

Mărimea antigenelor. Ca regulă generală, scăderea greutăţii moleculare a unui antigen, fără a-i modifica specificitatea, scade capacitatea lui de a induce un răspuns imun şi măreşte activitatea tolerogenă. Feno

menul este ilustrat de experiențele lui Parish și Ada (1969), care au studiat efectul imunizării animalelor cu trei forme moleculare de flagelină: un polimer cu g.m. 107 dal, un monomer cu g.m. 40 000 dal și un fragment din flagelina monomeră cu g.m. 18 000 dal. Ei au demonstrat existența unei modificări progresive, de la bun imunogen — slab tolerogen spre slab imunogen — puternic tolerogen, corespunzătoare trecerii de la moleculele mari spre cele mici. Capacitatea tolerogenă este pierdută dacă g.m. scade între 1 500 și 5 000 dal.

Compoziția chimică. Capacitatea de inducție a toleranței poate fi influențată de modificarea gradului de substituire a unei proteine cu o haptenă. Nossal și Pike (1981) au cuplat cantități diferite de haptene, fie pe gamaglobulină umană (GGU), fie pe ASB, fie pe fragmentul $F(ab')_2$ al GGU. Au demonstrat, pe această cale, că cu cît gradul de substituire cu haptene este mai mare, cu atît devine mai redusă cantitatea de antigen necesară pentru inducția toleranței. Aceleași cercetări au arătat că un produs cu un grad înalt de substituire este un tolerogen mai puternic decît conjugatele slab derivatizate.

Structura antigenică. În general, creșterea densității epitopilor pe suprafața unui antigen mărește tolerogenitatea și scade imunogenitatea. Această proprietate se corelează cu cercetările lui Nossal și Pike asupra conjugatelor haptenă/proteină. Densitatea minimă a epitopilor de pe un astfel de conjugat, necesară pentru inducția toleranței, este mai mare decît cea necesară pentru a-l face imunogen.

Antigenele nemetabolizabile sînt, în general, bune tolerogene, deoarece persistă timp îndelungat în organism în concentrații mari. Cele mai multe date au fost furnizate de cercetările efectuate la șoarece și iepure cu polizaharide de pneumococ tip III și cu unele peptide sintetice, formate din D-aminoacizi nenaturali, foarte rezistente la degradare, deoarece aceste specii nu au enzimele respective. Acest tip de substanțe nu prezintă toleranță de doză mică. Injectate în cantități mici (1 μg), produc răspuns în anticorpi, în timp ce cantitățile mari ($>$ 10 μg), lent sau greu degradabile, determină *paralizie imunologică* cu durată lungă.

Este probabil că antigenele „nedegradabile" sînt preluate rapid de fagocite, unde sînt reținute săptămîni sau luni, apoi sînt degradate lent și eliminate. Cantitățile mici de antigen eliberate continuu din fagocite induc formarea de anticorpi, cu care apoi se combină pentru a forma complexe antigen — anticorp. Acestea sînt rapid fagocitate de macrofage, în care anticorpii sînt distruși, iar antigenele nemetabolizabile sînt eliberate din nou în mediu, pentru a relua ciclul. În acest caz, celulele producătoare de anticorpi sînt prezente și pot fi evidențiate prin tehnica plajelor de liză descrisă de Jerne. Anticorpii nu pot fi însă evidențiați pentru că, pe măsură ce sînt produși, sînt legați de antigenele care persistă în ser. Detectarea lor directă depinde de raportul dintre cantitatea de anticorpi produși și cantitatea de antigen disponibilă, care le poate „masca" prezența, prin formarea de complexe imune. Acest fenomen de toleranță „periferică" diferit de toleranța imunitară „centrală" corespunde, în realitate, unei stări de *pseudotoleranță*.

În doze foarte mari ($\sim$ 100 µg), polizaharidele de tip III induc o stare veritabilă de toleranţă, în cursul căreia nu se formează nici plasmocite specifice, nici anticorpi (fig. 232).

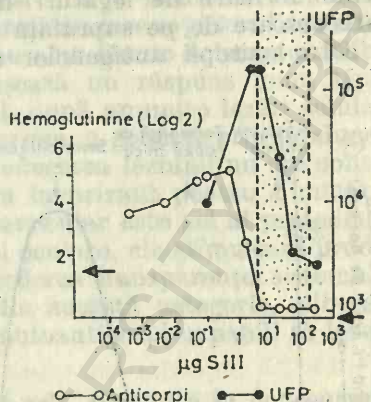


Fig. 232. — Toleranţa şi pseudotoleranţa faţă de polizaharidul de tip III de la *Streptococcus pneumoniae*. Pentru dozele de polizaharid (PS) cuprinse între 10 şi 100 µg (zona punctată) se observă discordanţă între absenţa anticorpilor şi prezenţa celulelor care formează plaje de hemoliză (UFP) în prezenţa hematiilor acoperite cu PS. Anticorpii sînt absorbiţi de antigenul care persistă, pe măsură ce sînt produşi. Numai la doze de PS mai mari de 100 µg nu se mai observă nici anticorpi, nici plaje de hemoliză (după Howard şi colab., 1971).

Mai multe date experimentale sugerează că „paralizia imunitară" este un proces relativ greu de controlat. Utilizarea unui protocol care teoretic ar trebui să inducă areactivitate poate să determine în unele cazuri răspuns imun de tip hiperreactiv.

Doza de antigen. Primele cercetări referitoare la influenţa dozei de antigen asupra capacităţii de a induce toleranţă au arătat că aceasta poate fi indusă cu atît mai uşor, mai intens şi mai durabil, cu cît doza de antigen este mai mare. Pentru aceeaşi doză globală, administrarea în doze mici, repetate, de antigen este mai eficientă decît injectarea unei doze unice. Ulterior s-a demonstrat că această influenţă este în realitate mult mai complexă, cel puţin pentru unele antigene T-dependente.

Mitchison (1968) a arătat că toleranţa faţă de albumina serică bovină (ASB) poate fi indusă la şoarecele adult cu două categorii de doze, diametral opuse. Au fost astfel descrise două tipuri de toleranţă :

1) *toleranţa de doză joasă* („Low zone tolerance") indusă prin injectarea continuă sau repetată a unor doze considerabil mai mici decît cele care dau toleranţa de doză mare şi inferioare, de asemenea, faţă de doza imunogenă ;

2) *toleranţa de doză mare* („High-zone tolerance") indusă de doze mari, supraimunogene, de antigen (fig. 233 A).

Fenomenul a fost confirmat de Shellam şi Nossal, care au indus toleranţa imunitară la şobolanii nou-născuţi, utilizînd diferite cantităţi de flagelină monomeră de la *Salmonella adelaide* (fig. 233 B). Doza tolerogenă optimă este de 0,1 pg/g greutate corporală/zi pentru toleranţa de doză joasă şi de 20—200 ng (0,2 µg) pentru cea de doză înaltă. Pe baza unor studii de transfer celular, Weigle (1971) consideră că toleranţa de doză joasă afectează celulele T_H, iar cea de doză mare atît celulele T_H, cît şi celulele B. Antigenele timoindependente, în general, nu produc

acest tip de răspuns. Toleranța poate fi obținută cu doze mai mici doar în cazul celulelor B, cu afinitate mare de legare, și cu antigene polimere sau cu conjugate haptenă — proteine avînd o mare densitate de determinanți antigenici. După Siskind (1984), în aceste situații, un rol important revine formării de legături multiple între moleculele de antigen și Ig-receptoare de pe suprafața celulelor B, precum și interconectării lor de către epitopii antigenelor utilizate.

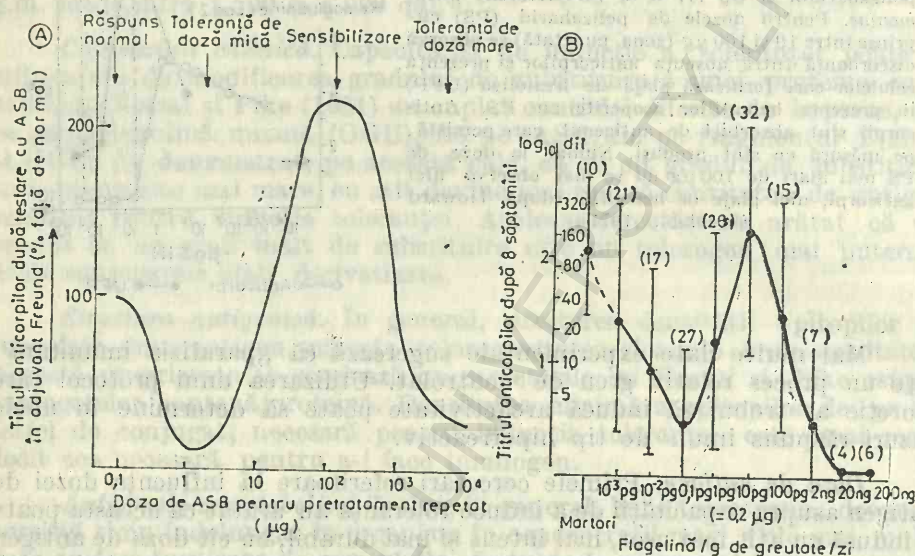


Fig. 233. — A. Producerea toleranței de zonă joasă și de zonă înaltă la șoarece prin injecții repetate de albumină serică bovină (ASB). Toleranța a fost testată prin inocularea animalelor cu ASB, într-o formă foarte imunogenă, asociată cu un adjuvant (după Mitchison, 1968). **B.** Evidențierea celor două zone de posologie antigenică ce induc toleranța imunitară la șobolanii nou-născuți. Pe abscisă, cantitățile de antigen injectate (flagelină monomeră de la *Salmonella adelaide*); pe ordonată, titrul aglutininelor serice, în paranteze, numărul animalelor din fiecare grup (după Shellam și Nossal, 1968).

Calea de administrare. Anumite căi de administrare a antigenelor par să favorizeze inducția toleranței, în dauna producerii unui răspuns imun. Fenomenul este mai evident în cercetările efectuate pe animale adulte și cu antigene particulate și greu difuzibile (spre deosebire de antigenele solubile, care difuzează rapid, echilibrînd răspîndirea lor rapidă între spațiile intra- și extracelulare, indiferent de locul în care au fost injectate).

În general, căile subcutanată și intramusculară favorizează răspunsul imun, iar căile orală, intravasculară (în vena mezenterică) și intragastrică (cu sondă stomacală) favorizează toleranța. În general, inducția toleranței este favorizată de căile care asigură îndepărtarea componentelor imunogene ale antigenelor, în special cînd trec prin filtrul biologic reprezentat de ficat, care lasă neprelucrate și neafectate componentele tolerogene ale antigenelor. Unele antigene se comportă ca tolerogene, în special cînd sînt injectate pe căi neobișnuite (spre exemplu, direct intratimic la șobolanii adulți).

După Wigzell (1986), în funcție de capacitatea lor de a produce toleranță, antigenele self pot fi grupate în trei categorii.

1) Prima categorie include antigene „sechestrate" intracelular, în mod normal „ascunse" constituenților sistemului imunitar. Ele sînt prezente în concentrații atît de mici în situsurile în care se găsesc limfocitele încît nici celulele T și nici limfocitele B nu sînt făcute tolerante. Eliberarea lor accidentală în circulație declanșează un răspuns imun tipic. Unele dintre ele pot fi eliberate accidental, după anumite lezări celulare (arsuri, infarct miocardic etc.). Răspunsul autoimun generat prin producere de anticorpi după ~ o săptămînă de la producerea leziunii nu are consecințe negative. El poate avea chiar un efect favorizant pentru eliminarea mai rapidă a țesuturilor moarte. Un caz particular este cel al proteinelor din cristalin. Eliberate în urma unor leziuni oculare, ele stimulează producerea de autoanticorpi ce pot determina pierderea transparenței sistemului optic al ochiului. În general, antigenele din această categorie, eliberate din țesuturile normale, induc formarea de autoanticorpi capabili să lezeze țesuturile și celulele anterior nelezate.

2) A doua categorie include antigene self, prezente în concentrații foarte mici, care, datorită particularităților de răspuns la doza de antigen, fac tolerante celulele T_H, în timp ce limfocitele B rămîn funcționale. Ele nu determină producerea de anticorpi față de antigenele T-dependente. Situația poate deveni gravă în eventualitatea stimulării celulelor B pe altă cale, diferită de cea a celulelor T_H.

3) A treia categorie, neinteresantă din punctul de vedere al fenomenelor de autoimunitate, este reprezentată de antigenele self prezente în concentrații atît de mari încît existența celulelor T și B capabile să interacționeze cu ele este greu de probat. Chiar dacă, spre exemplu, celulele B specifice pentru antigenul respectiv ar exista, concentrația acestuia în organism este atît de mare încît blochează receptorii acestora, împiedicînd evidențierea lor.

Maturitatea imunologică a gazdei. Numeroase date experimentale au demonstrat că toleranța imunitară poate fi indusă cel mai ușor la animalele imature imunologic, aflate în viața fetală sau imediat postnatal. S-a evidențiat faptul că, la șoarece și iepure, capacitatea de a produce un răspuns imun activ apare numai după 8—15 zile de la naștere și că în cursul acestei perioade animalele nou-născute sînt la fel de sensibile la inducția toleranței ca și fătul. Aceste date au sugerat că în viața fetală și la nou-născut ar exista o perioadă critică („The period of tolerization"), în cursul căreia toleranța apare cel mai ușor. Începutul ei urmează colonizării inițiale a timusului și a țesuturilor limfoide secundare, corespunzînd perioadei în care celulele imature au început să exprime receptori de antigen pe suprafața lor, dar nu au atins gradul de maturare necesar pentru a manifesta competență imunologică. În cursul acestei perioade, contactul cu antigenul determină o modificare a dezvoltării limfocitelor, însoțită de pierderea funcției imunitare, respectiv de o areactivitate specifică față de antigenul inductor. Ea are la bază, în cazul celulelor B, stoparea sintezei receptorilor de antigen, respectiv a moleculelor de Ig de suprafață celulară. Ceva mai tîrziu, în cursul diferențierii celulelor B, devenite mai

rezistente, inducţia toleranţei necesită, în unele sisteme experimentale, cantităţi de antigen de 1 000—10 000 de ori mai mari decît cele active pe celulele imature (fig. 234).

O evoluţie similară este posibilă şi în cazul diferenţierii celulelor T, deşi nu a fost încă demonstrată fără echivoc.

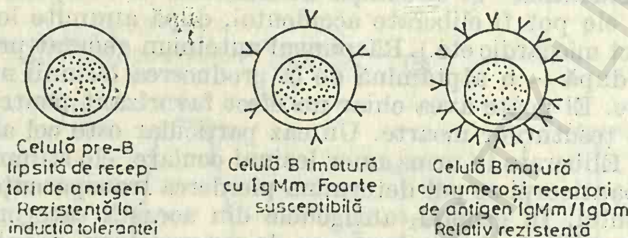


Fig. 234. — Influenţa maturităţii imunologice a gazdei asupra procesului de inducţie a toleranţei. Figura prezintă sensibilitatea diferită la toleranţă a celulelor B, în cursul a trei stadii succesive de maturare.

Comportarea diferită a celulelor B imature şi mature are la bază unele particularităţi evidenţiate experimental:

1) Nossal şi Pike (1981), studiind capacitatea anticorpilor faţă de catena μ a IgM de a induce toleranţa celulelor B, au demonstrat că este necesară o cantitate de trei ori mai mare de anticorpi pentru a inhiba mitogeneza sau producerea de anticorpi la adult decît la nou-născut.

2) Chen (1983) a confirmat aceste date, demonstrînd o comportare diferită a celor două tipuri de celule în prezenţa serului antiimunoglobulinic. Astfel, în cazul celulelor B mature, fenomenul de „bonetare" („Capping") poate fi produs cu o cantitate mai mică de anticorpi. După ce s-a produs, moleculele de IgMm dispar prin endocitoză, fiind îndepărtate, pentru ca după o perioadă de timp (~ o zi) să fie resintetizate. În cazul celulelor B imature, „bonetarea" este produsă cu cantităţi mai mari de ser anti-Ig şi nu este urmată de resinteza receptorilor IgMm. Ea duce invariabil la apariţia unor limfocite B lipsite de receptori de antigen pe suprafaţa membranei şi deci areactive. Ele rămîn viabile, dar după transferul lor adoptiv la o gazdă cu deficit imun sînt incapabile să-şi refacă reactivitatea normală. Diferenţele în inducţia toleranţei reflectă diferenţe în sensibilitatea celulelor T şi B imature şi mature faţă de semnalele tolerogene, transduse în celule pe calea receptorilor specifici de antigen de pe suprafaţa membranelor lor. Este posibilă şi intervenţia unor factori accesorii, ca, de exemplu, o activitate T_H deficitară sau o funcţie deficitară a macrofagelor, care favorizează instalarea toleranţei la nou-născuţi.

În concluzie, cu cît nivelul de imunocompetenţă (maturitate imunologică) este mai ridicat, cu atît toleranţa imunitară este mai greu de indus. Animalele cu deficit imunitar sînt mai uşor făcute tolerante decît

cele normale, indiferent dacă deficitul este normal și spontan (ca la făt și nou-născut) sau dacă este indus prin acțiuni imunosupresoare sau patologic.

Rolul influențelor genetice nu este categoric definit, deși unele observații îl sugerează, în unele cazuri, ca deosebit de semnificativ. Mai multe cercetări semnalează existența unor diferențe mari între anumite linii genetice de șoarece, în susceptibilitatea față de inducția toleranței și în menținerea ei. La unele animale, toleranța este indusă cu dificultate și doar pentru o perioadă scurtă de timp. Spre exemplu, șoarecii NZB și hibrizii NZB/NZW, predispuși la boli autoimune, sînt, în mod particular, rezistenți la inducția toleranței față de anumite antigene.

Cauzele diferențelor genetice în sensibilitatea la inducția toleranței nu sînt cunoscute. După Siskind (1984), uneori genele Ir localizate în regiunea complexului major de histocompatibilitate pot influența inducția toleranței indirect, favorizînd activarea celulelor supresoare sau făcînd anumiți purtători neimunogeni pentru o anumită linie genetică. După Leskowitz și colab. (1975), fenomenul ar fi corelat cu unele diferențe în funcția macrofagelor.

Cinetica toleranței induse

Instalarea stării de toleranță a fost, în general, studiată prin metoda transferului de celule. Animalele inoculate cu substanțe tolerogene sînt sacrificate la diferite intervale de timp și celulele lor limfocitare „spălate" sînt transferate la organisme receptoare singenice iradiate, care apoi sînt testate cu antigenul respectiv, inoculat în condiții adecvate producerii unui răspuns imun. Rezultatele sînt foarte variabile și contradictorii.

În experiențele lui Mitchison (1968), toleranța la doze mari de albumină serică bovină (ASB) poate fi detectată după două ore la șoarecele adult, în cazul limfocitelor periferice circulante, și în ~24 de ore, în celulele splenice. Utilizînd gamaglobulină umană (GGU), Chiller și Weigle (1972) au semnalat după 6 ore numai o diminuare semnificativă a reactivității; toleranța se instalează abia după 5 zile. În mod asemănător, toleranța la doze mari de polizaharid de pneumococ apare după 4—5 zile. Diferențele mari dintre aceste rezultate reflectă natura diferită a mecanismelor inductoare și a celulelor tolerante. Limfocitele T timice și periferice devin tolerante foarte repede și aparent după un interval de timp aproximativ egal. Celulele B devin tolerante mult mai lent decît celulele T, respectiv în 3—5 zile cele splenice și după 8—15 zile cele medulare.

Starea celulelor tolerante

Datele referitoare la starea celulelor devenite tolerante sînt foarte contradictorii. Unii autori au observat o diminuare a numărului limfocitelor la animalele tolerante și consideră că semnalul sau semnalele primite de anumite celule, în cursul inducției, determină moartea celulelor respective și probabil a altor celule aparținînd aceleiași clone. Alți cercetători au semnalat existența unui număr egal de limfocite sau chiar ușor mărit la animalele tolerante. După punerea la punct a tehnicilor de identificare a celulelor T și B s-a demonstrat comportarea diferită a celor două tipuri de celule.

Cînd toleranţa este indusă predominant de celulele T, numărul este foarte puţin diminuat sau chiar normal. În schimb, toleranţa indusă predominant de celulele B este asociată cu diminuarea numărului celulelor specifice. Nu se ştie dacă această diminuare este reală (respectiv determinată de moartea celulelor) sau doar consecutivă pierderii capacităţii de sinteză a moleculelor de Ig-receptor de pe suprafaţa lor (Benacerraf, 1977). Este probabil că rezultatele contradictorii asupra numărului limfocitelor depind de natura mecanismului operant în forma de toleranţă indusă. Deleţia clonală ar fi asociată cu diminuarea numărului lor, în timp ce supresia activă, dată de celulele T_S, ar fi asociată cu un număr normal sau uşor crescut.

Toleranţa indusă este incriminată în patogenia unor boli, care, ca adevărate experienţe ale naturii, reproduc anumite forme şi mecanisme de toleranţă induse experimental. Un exemplu caracteristic este furnizat de pneumonia pneumococică ce apare, în general, înainte de moartea bătrînilor subnutriţi. Datorită infecţiilor repetate, concentraţia polizaharidelor pneumococice greu metabolizabile prezente în ţesutul pulmonar creşte progresiv pe măsură ce bolnavii înaintează în vîrstă. Ele reacţionează cu anticorpii produşi iniţial în cantităţi foarte mari, formînd complexe imune. Acestea sînt fagocitate de macrofage şi de neutrofile, în care anticorpii sînt degradaţi enzimatic, iar antigenele eliminate în mediu. Pe măsură ce concentraţia lor în ţesutul pulmonar creşte, celulele B sînt funcţional inactivate şi făcute tolerante, fie prin blocarea receptorilor, fie prin mecanismul „treadmill". Toleranţa afectează iniţial limfocitele B cu aviditate mare de legare a antigenelor, dar pe măsură ce infecţiile se repetă şi concentraţia antigenului creşte sînt afectate şi cele cu aviditate mică de legare. Final, se instalează o stare de toleranţă, de areactivitate completă sau totală faţă de antigenul respectiv. În această fază, o nouă infecţie declanşează o formă mortală de pneumonie, descrisă de autorii anglosaxoni sub denumirea semnificativă de „prietenul oamenilor bătrîni" („Old man's friend").

Rolul celulelor T şi B în toleranţă

Chiller şi Weigle (1971) au demonstrat că ambele clase majore de limfocite, celulele T şi B, pot fi afectate de toleranţa imunitară. Susceptibilitatea lor diferită este reflectată de doza diferită de tolerogen necesară pentru inducţie, de cinetica apariţiei şi de persistenţa toleranţei (fig. 235). Ei au indus toleranţa unor şoareci singenici cu o singură injecţie de gamaglobulină umană (GGU) „dezagregată". Toleranţa indusă se manifestă prin incapacitatea lor de a produce anticorpi anti-GGU, cînd sînt reinoculaţi cu forma agregată, imunogenă, a GGU la diferite intervale după administrarea formei tolerogene (fig. 236). După sacrificare, celulele din timus şi din splină provenite de la animalele tolerante, asociate cu aceleaşi tipuri de celule de la animale normale singenice (netolerante), au fost transplantate la animale singenice iradiate. După o perioadă corespunzătoare, necesară pentru reconstituirea sistemului imunitar, animalele receptoare au fost imunizate cu o doză imunogenă de GGU agregate şi testate pentru capacitatea celulelor splenice de a produce anticorpi specifici *in vitro* (tehnica plajelor de liză — Jerne).

Utilizarea acestui sistem experimental a permis obținerea unor concluzii cu caracter general, precum și stabilirea particularităților de comportare a celor două tipuri de celule. S-a demonstrat astfel că atît celulele T, cît și celulele B sînt în mod deosebit sensibile la tolerogene în

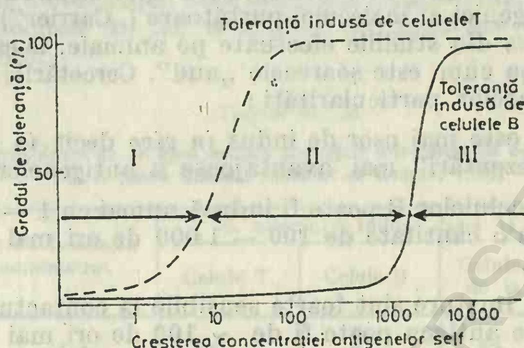


Fig. 235. — Inducția toleranței dependentă de doză, față de antigenele self timoindependente (după Hanson și Wigzell, 1985).

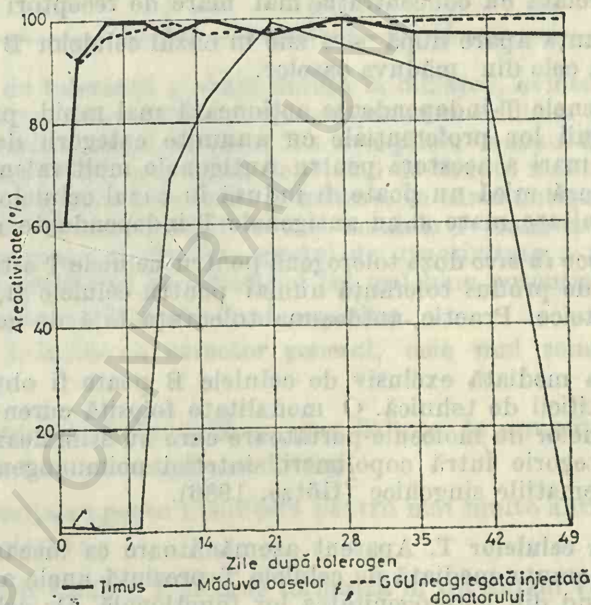


Fig. 236. — Celulele medulare și timice ale șoarecilor toleranți la gamaglobuline umane (GGU) „neagregate" rămîn areactive la injecția cu GGU „agregate". Cînd aceste celule sînt injectate la animalele iradiate, în asociere cu celule normale, celulele medulare devin areactive mai tîrziu și își recapătă reactivitatea mai curînd decît celulele timice (după Weigle, 1976).

stadiile precoce ale diferențierii din limfocitele precursoare. În aceste stadii, contactul chiar cu doze mici de antigen paralizează sau elimină celulele T și B imature. Datorită interacțiunii cooperante a celulelor T_H—B,

în cazul antigenelor T-dependente, ambele tipuri de toleranţă duc la incapacitatea de a elabora un răspuns imun umoral complet.

Toleranţa celulelor B este relativ greu de studiat experimental *in vivo* din cauza intervenţiei celulelor T_H, care emit semnale helper pentru determinanţii antigenici ai moleculei-purtătoare („Carrier"). Foarte multe date au fost deduse din studiile efectuate pe animale, la care celulele T_H sînt inoperante, aşa cum este şoarecele „nud". Cercetările au permis evidenţierea următoarelor particularităţi:

1) Toleranţa este mai uşor de indus *in vivo* decît *in vitro*, probabil datorită unei „prezentări" mai avantajoase a antigenelor.

2) Toleranţa celulelor B poate fi indusă numai cu 1 —10 mg de tolerogen, respectiv cu o cantitate de 100 — 1 000 de ori mai mare decît în cazul celulelor T.

3) Celulele B imature sînt foarte sensibile la contactul cu antigenul (doza tolerogenă de antigen poate fi de ~ 100 de ori mai mică în cazul celulelor provenite de la animale nou-născute decît la adult), deoarece celulele B devin progresiv mai rezistente la contactul cu antigenul pe măsură ce se maturează; dificultatea mai mare de a face tolerante celulele B poate fi corelată cu concentraţia mai mare de receptori de suprafaţă.

4) Toleranţa apare după ~ 4 zile în cazul celulelor B din splină şi în ~ 15 zile la cele din măduva oaselor.

5) Antigenele T-independente acţionează mai rapid, probabil datorită interacţiunii lor preferenţiale cu anumite categorii de celule B şi avidităţii mai mari a acestora pentru antigenele multivalente. De aceea, toleranţa de doză mică nu poate fi indusă în cazul celulelor B decît cu celulele cu afinitate mare şi cu antigenele T-independente multivalente;

6) Deoarece *in vivo* doza tolerogenă pentru celulele T este foarte mică, este imposibil de produs toleranţă numai pentru celulele B, cel puţin cu antigenele proteice. Practic, totdeauna toleranţa faţă de celulele T este asociată.

Toleranţa mediată exclusiv de celulele B poate fi obţinută numai cu anumite artificii de tehnică. O modalitate folosită curent este cea de legare a haptenelor de molecule-purtătoare care nu stimulează celulele T. În această categorie intră copolimerii sintetici neimunogeni, proteinele omologe sau hematiile singenice (Götze, 1986).

Toleranţa celulelor T. Aparent asemănătoare ca mecanism celei a celulelor B, toleranţa mediată de celulele T prezintă unele aspecte particulare, decurgînd din heterogenitatea lor funcţională. De cele mai multe ori, în funcţie de circumstanţe încă neelucidate, toleranţa (deleţia clonală sau eliminarea funcţională) afectează o singură subpopulaţie de celule T_H, T_c sau T_{DH} şi determină, implicit, suprimarea unei singure funcţii a populaţiei globale de celule T. Toleranţa este indusă numai de antigene recunoscute normal (în asociere cu antigenele CMH).

Toleranţa celulelor T apare în cîteva ore după injecţia antigenelor T-dependente şi durează > 100 de zile. Ea poate fi indusă cu doze foarte

mici, subimunogene, de antigen (10 μg). Această particularitate a fost demonstrată de Chiller, Habicht şi Weigle (1971), care au apreciat reactivitatea celulelor din timus şi măduva oaselor la şoarece după inducţia toleranţei la IgG umană, lipsită de „agregate" moleculare prin transfer la receptori iradiaţi. Rezultatele obţinute demonstrează cu evidenţă faptul că dozele de tolerogen care afectează numai o mică parte din celulele medulare (limfocitele B) fac areactive aproape toate celulele T (tabelul nr. 59; fig. 236).

Tabelul nr. 59

Efectul dozei de antigen asupra inducţiei toleranţei în celulele T şi B (după Chiller, Habicht şi Weigle, 1971)

Mg de tolerogen administrat	% toleranţei induse după 11 zile		
	Celule T	Celule B	Celule splenice de la donator
0,1	96	9	62
0,5	99	56	97
2,5	99	70	99

Gradul de toleranţă globală indusă la donator, evident în răspunsul splinei ca întreg, este determinat de comportarea celulelor T. Durata mai îndelungată decît în cazul celulelor B s-ar explica, în cazul deleţiei clonale, de revenirea mai lentă la normal, depinzînd de timpul mai lung de regenerare de la celulele-stem la celulele T mature. În cazul antigenelor T-dependente, utilizate în concentraţii în care celulele T joacă un rol cooperant major în formarea anticorpilor, gradul de reactivitate a populaţiilor de celule T este considerat ca reflectînd cel mai bine potenţialul performanţelor imunologice globale ale unui organism.

Între concluziile cu caracter general, cele mai semnificative sînt următoarele:

1) toleranţa este limitată ca specificitate la anumiţi determinanţi antigenici şi nu la un antigen ca întreg;

2) toleranţa se poate manifesta pentru mai multe antigene dacă dau reacţii încrucişate;

3) întrucît celulele T şi B se formează în tot cursul vieţii unui organism, prin diferenţierea precursorilor din timus şi măduva oaselor, inducţia toleranţei (paralizia sau eliminarea clonelor de celule antiself) este condiţionată de un proces activ şi continuu;

4) în cazul în care este determinată de blocarea receptorilor cu doze mari de antigen, transferul celulelor tolerante într-un mediu lipsit de antigen este urmat de pierderea relativ rapidă a toleranţei.

Mecanismele toleranței

După Hood și colab. (1984), eliminarea antigenelor străine, ca și toleranța față de antigenele self sînt două procese active, care necesită răspunsul continuu al sistemului imunitar. Ele implică, probabil, participarea aceleiași rețele de răspunsuri potențiale, care duc la rezultate diametral opuse față de cele două tipuri de antigene. Datele actuale demonstrează complexitatea mecanismelor care stau la baza inducției toleranței. Ele sînt încă incomplet cunoscute, spre deosebire de efectele lor reprezentate de faptul că limfocitele care poartă pe suprafață receptorii specifici pentru determinanții self sînt fie distruse și eliminate („clonal deletion"), fie stopate în procesul lor de maturare („clonal abortion"), fie inactivate ireversibil („clonal amnesia"), fie supresate. Următoarele mecanisme sînt susținute de mai multe observații și date experimentale :

Teoria deleției clonale, propusă de Burnet și Fenner (1958), consideră că toleranța rezultă din eliminarea, în cursul ontogeniei, a subpopulațiilor de limfocite care vin în contact cu constituenții proprii ai organismului respectiv. Teoria propune ca fiind „interzisă" („Forbbiden clones theory") existența clonelor care potențial ar putea reacționa cu autoantigenele, declanșînd fenomene de autoimunitate și autoagresiune. Eliminarea celulelor self-reactive s-ar realiza în timus, fapt dedus indirect din existența unui număr mare de timocite moarte ce pot fi evidențiate la nivelul acestuia. Ipoteza este susținută și de unele experiențe de toleranță indusă activ, care sînt asociate cu diminuarea numărului limfocitelor T_C, specifice antigenului tolerat, ceea ce presupune o deleție sau o inactivare a lor. Existența deleției este demonstrată de persistența areactivității după transferul celulelor provenite de la un animal tolerant într-un mediu lipsit de antigen (cultură de celule), în condiții în care nu poate fi demonstrată prezența celulelor T_S (Siskind, 1984).

În același timp, unele date contradictorii fac pe unii cercetători să considere acest mecanism ca improbabil. Astfel, s-a demonstrat că, în anumite condiții, limfocitele tolerante pot fi sensibilizate *in vitro* față de țesuturile singenice, ceea ce arată că celulele specifice nu sînt eliminate, ci supresate sau făcute funcțional inactive. În același sens pledează și unele anchete serologice extinse la animale și la om, care au urmărit prezența autoanticorpilor la organismele normale. Ele au evidențiat prezența cu o frecvență semnificativă a anticorpilor față de o gamă relativ largă de autoantigene, ca, de exemplu : tubulină, actină, transferină, mioglobină, fetuină, tiroglobulină, colagen, citocrom *c*, unele proteine scheletale, ADN, elastină, hematii, celule timice, celule parietale gastrice, antigene cerebrale, limfocite etc. Prezența între aceștia a anticorpilor față de unele autoantigene „expuse" și nu obligatoriu „ascunse" („sechestrate") este în dezacord cu teoria deleției clonale, ca singur mecanism al toleranței la self (Cruse și Lewis, 1987). În același sens pledează și observațiile asupra anemiei hemolitice a șoarecilor NZB, care este dată de autoanticorpi produși față de un antigen glicoproteic de pe suprafața hematiilor.

Într-o variantă apropiată a ipotezei deleției clonale („Clonal abortion theory ") (engl. „Abortion" = incapacitatea de a desfășura o acțiune, oprirea în dezvoltare a unei celule sau organ), toleranța ar fi determinată

de inactivarea efectivă, permanentă, a clonelor de celule T și B, prin împiedicarea maturării lor la celule imunocompetente în urma contactului cu antigenele în cursul vieții embrionare. În acest caz, factorul principal în inducția toleranței este imaturitatea celulelor B.

Ipoteza diferențierii terminale exhaustive consideră ca mecanism tolerogen potențial procesul de diferențiere terminală completă („Exhaustive terminal differentiation"), prin care, practic, toate celulele aparținînd unei anumite subpopulații de limfocite B, cu specificitate dată, sînt stimulate să se diferențieze la plasmocite, fără să producă celule cu memorie. În felul acesta, animalul este practic lipsit de celulele B capabile să reacționeze cu un anumit antigen. El redevine capabil să reacționeze specific cu antigenul în cauză cînd are loc regenerarea celulelor B specifice din precursorii medulari.

Ipoteza se bazează, între altele, pe observația că, în unele cazuri, cu cît doza de antigen administrată unui animal nou-născut pentru inducția toleranței este mai mare, cu atît producerea inițială de anticorpi este mai intensă și gradul de toleranță mai ridicat. Mecanismul ar fi activ, în special, în cazul antigenelor T-independente, de tipul polizaharidelor (Howard și colab., 1970).

Toleranța „Treadmill". Sub această denumire (engl. „Treadmill" = roată de ocnă, instrument de tortură, muncă mecanică, monotonă) a fost formulată o teorie mai veche, care concilia observația că cel puțin în unele sisteme tolerogene, deși se produceau anticorpi, existența lor liberă în circulație era imposibil de evidențiat.

Ipoteza presupune un mecanism operativ în cazul toleranței induse de concentrații mari de antigen, în care anticorpii, abia formați, sînt legați de antigen, pentru a forma complexe imune, care sînt rapid fagocitate. În fagocite, anticorpii sînt degradați proteolitic, iar antigenele nedegradate sînt eliberate, pentru a relua ciclul. Mecanismul ar acționa, cel puțin tranzitoriu, după injecții de doze mari de polizaharide tolerogene. Se consideră că nu ar avea un rol important decît în circumstanțe excepționale.

Toleranța mediată de anticorpi. Ipoteza se bazează pe observațiile lui Dresser și Gowland (1964). Ei au arătat că producerea de anticorpi, în cantități mici, consecutivă injectării unui antigen inductor de toleranță, poate determina diminuarea răspunsului imun față de același antigen injectat ulterior. S-a demonstrat că administrarea pasivă de anticorpi exercită un efect specific asemănător, mai evident în cazul utilizării anticorpilor cu mare afinitate de legare decît al celor cu afinitate redusă. Fenomenul are la bază, probabil, legarea rapidă a antigenelor, formarea de complexe imune fagocitabile, ușor de eliminat, și împiedicarea stimulării antigenice. Mecanismul este considerat ca posibil, dar rolul său *in vivo* nu pare să fie deosebit de important.

Un alt mecanism potențial este cel observat după injectarea unor cantități mai mari de anticorpi specifici unui antigen imunizant, care suprimă răspunsul imun față de antigenul respectiv. *In vivo*, imunosupresia este corelată cu mecanismul homeostatic de feedback, prin care,

după ce sistemul imunitar a produs o cantitate suficientă de anticorpi, activitatea lui este stopată. Celulele producătoare de anticorpi leagă complexele antigen — anticorp, via receptorul Fc de pe suprafaţa lor. Se realizează o supresie, care poate fi indusă şi cu fragmente de Ig, lipsite de porţiunea Fc. Aceste date sugerează că simpla blocare a determinanţilor antigenici de anticorpi împiedică stimularea limfocitelor şi acţionează ca mecanism de imunosupresie.

În inducţia toleranţei au fost incriminate şi alte mecanisme însă rolul lor în organism este greu de apreciat. Între acestea un rol mai semnificativ ar putea avea **toleranţa indusă de anticorpii antiidiotipici.** Prezenţa lor în organism poate determina deleţia funcţională specifică a clonelor de celule B, care poartă idiotipul respectiv. Ei pot inhiba sinteza şi secreţia anticorpilor cu idiotipul respectiv de către celulele B mature.

În sfîrşit, un alt mecanism posibil ar fi reprezentat de **absenţa** sau **deficitul funcţional al celulelor T contrasupresoare.** În aceste condiţii, celulele T_H sînt în mod deosebit sensibile la acţiunea celulelor T_S. Starea normală supresată a sistemului imunitar persistă şi după injectarea antigenului, celulele T_H nu pot fi activate şi răspunsul imun nu poate fi declanşat.

Blocarea antigenică a celulelor B efectoare. Toleranţa imunitară poate fi determinată şi de legarea antigenelor de moleculele de Ig-receptor, prezente pe suprafaţa celulelor B, în condiţii în care în loc să determine activarea acestora produc „inactivarea" lor funcţională. Efectul poate fi produs atît de antigenele multivalente, cu determinanţi antigenici repetitivi, spaţiaţi regulat, care pot „imobiliza" receptorii Ig, „îngheţînd" membrana celulară, cît şi de antigenele monovalente, care acţionează printr-un efect de saturare a acestora, fără să producă interconectarea necesară pentru activare.

Ipoteza se bazează pe observaţiile lui Schrader şi Nossal (1974), care au demonstrat posibilitatea diminuării specifice a sintezei de anticorpi, prin interconectarea moleculelor de Ig membranare sub acţiunea antigenelor polivalente, fără să afecteze sinteza proteinelor în general. Fenomenul are o durată scurtă şi este reversibil : îndepărtarea enzimatică a antigenelor permite reluarea sintezei anticorpilor. Utilizarea conjugatelor haptenă — proteină marcate a permis evidenţierea lor pe suprafaţa celulelor B, în perioada de toleranţă, şi a relaţiei dintre îndepărtarea lor şi recăpătarea capacităţii de formare a anticorpilor. Interacţiunea a fost reprodusă şi cu peptidele antigenice formate din D-aminoacizi, care blochează în mod asemănător, însă ireversibil, receptorii imunoglobulinici la animalele care nu au enzime capabile să le degradeze. Blocarea receptorilor poate fi realizată şi de complexele imune ca şi de anticorpii antiidiotip. În general, acest mecanism de inducţie a toleranţei ar avea la bază împiedicarea cooperării dintre celulele B, T_H şi macrofage. Rolul său *in vivo* este apreciat ca puţin semnificativ, între altele datorită rarităţii cu care este întîlnit.

Menținerea stării de toleranță

Datele referitoare la condițiile de menținere a toleranței sînt uneori contradictorii. În general, se consideră că menținerea toleranței depinde de persistența antigenului în circulație sau în alt loc în organism. Ideea se bazează, în primul rînd, pe concepția că antigenele joacă un rol activ în areactivitatea imunitară, prin depunerea lor pe suprafața celulelor producătoare de anticorpi și blocarea fizică a sintezei. S-a observat, de asemenea, că, în unele cazuri, durata toleranței poate fi prelungită prin injecții periodice de antigen (în general, mai mici decît cele utilizate pentru inducție). Pe această bază s-a sugerat că dacă concentrația antigenului în organism scade sub o limită critică, celula își poate recăpăta starea de areactivitate, paralel cu atenuarea stării de toleranță. După Weigle (1971), nevoia de persistență a antigenului pentru menținerea toleranței ar fi limitată la supresia răspunsului imun al celulelor noi, producătoare de anticorpi, care apar prin maturarea precursorilor din organele limfoide primare. În foarte multe situații, toleranța nu se pierde după eliminarea tolerogenului, iar în cazul celei produse de celulele T_S persistă chiar mult timp după dispariția acestuia din organism.

Weigle (1971, 1973) este tentat să atribuie antigenului un rol mai pasiv, astfel încît animalele pot fi areactive și rămîn ca atare cel puțin o perioadă de timp în absența lui din organism. În acest caz, persistența toleranței s-ar putea explica pe trei căi: 1) complexarea antigenului cu celulele imunocompetente, urmată de fagocitoza complexului ar duce la moartea celulelor; 2) plasmocitele și precursorii lor ar fi inhibați ireversibil și forțați să se diferențieze într-o direcție diferită de producerea de anticorpi; 3) antigenele ar fi eluate de pe receptorii celulelor, dar acestea, lipsite de antigen, ar rămîne totuși areactive.

Terminarea toleranței

Toleranța imunitară indusă la animalele adulte diferă de cea naturală, față de antigenele self, prin faptul că există o perioadă limitată de timp, după care, dacă nu este stimulată, scade progresiv. Chiar iepurii făcuți areactivi la naștere (forma cea mai stabilă a toleranței induse) pierd după $\sim$6 luni din areactivitate, indiferent de natura antigenului la care au fost toleranți, și încep să producă anticorpi. Durata perioadei de toleranță este variabilă în funcție de natura animalului utilizat, de tipul de toleranță produs, de modul de inducție etc. În general, cu cît doza de tolerogen este mai mare, cu atît durata areactivității este mai prelungită. Fenomenul este cel mai bine evidențiat în cazul antigenelor nemetabolizabile. Terminarea ei poate fi apreciată prin observarea capacității de a reacționa cu antigenul prin declanșarea unui răspuns imun, asociat de regulă cu producerea de anticorpi.

Încetarea toleranței față de un anumit antigen se poate realiza pe două căi:

1) Terminarea spontană are loc cu o viteză care reflectă, în general, durata de producere, de la celulele-stem, a precursorilor limfocitelor imunocompetente făcute tolerante în mod specific. La rîndul său, aceasta este influențată de prezența sau de absența antigenului din organism. Ca

regulă generală, cît timp tolerogenul este menținut în concentrații adecvate în organism, starea de toleranță poate fi menținută prin inducția areactivității celulelor imature, care sînt produse continuu în organism și care sînt foarte susceptibile la toleranță.

2) **Terminarea indusă experimental.** În ultimii ani au fost puse la punct o serie de procedee care vizează grăbirea vitezei de eliminare a tolerogenului din organism, eliminarea selectivă a celulelor T_S, refacerea stocului de limfocite imunocompetente și, în general, încetarea toleranței.

„Vindecarea" este stimulată de toți factorii care favorizează înlocuirea celulelor imunocompetente, ca, de exemplu, iradierea cu doze mici de radiații X, stimulatoare ale regenerării celulelor-stem medulare, transferul de limfocite singenice de la un donator normal etc. Animalele tinere au tendința să se „vindece" mai rapid, recăpătîndu-și capacitatea de a produce un răspuns imun, spre deosebire de animalele timectomizate sau foarte bătrîne (Siskind, 1984).

Terminarea indusă este de două tipuri:

a) *Terminarea specifică* reprezintă recîștigarea capacității de a răspunde specific la un determinant antigenic la care organismul a fost anterior areactiv.

b) *Terminarea nespecifică* corespunde unei schimbări globale a stării imunitare, cu pierderea areactivității și cu redeșteptarea imunocompetenței nu numai față de un determinant antigenic sau față de un singur antigen. În general, revenirea reactivității este mai rapidă în populația de celule B, a căror regenerare la nivelul normal de la celulele-stem, după iradiere, se produce rapid ($\sim$ 3 săptămîni). Dispariția toleranței se produce însă abia după 2—3 luni, ceea ce sugerează că este un proces mai complex, care implică, pe lîngă înlocuirea clonelor lipsă, și alte modificări. Practic, după 4 luni, celulele B ajung la o reactivitate normală sau chiar ușor crescută. După acest interval, persistența toleranței este asigurată de areactivitatea celulelor T_H specifice, care influențează activitatea limfocitelor B.

Printre procedeele menite să determine „terminarea" toleranței induse experimental, cele mai importante sînt următoarele (Siskind, 1984):

Imunizarea cu antigene care reacționează încrucișat. Weigle (1971) a demonstrat posibilitatea întreruperii toleranței prin imunizarea animalelor cu antigenul tolerat, modificat chimic, sau cu un antigen străin cu care acesta reacționează încrucișat. Astfel, toleranța față de tiroglobulină sau albumina serică bovină (ASB) poate fi întreruptă prin imunizarea animalelor cu moleculele respective denaturate chimic, conjugate cu haptene (picril, arsonat, arsenilat etc.) sau parțial degradate pe cale enzimatică. În mod asemănător, toleranța față de gamaglobulina umană (GGU) poate fi întreruptă prin imunizare cu gamaglobulină bovină (GGB), care are unii epitopi comuni cu GGU, dar și anumite diferențe antigenice. Epitopii diferiți induc activarea unor celule T_H, care stimulează atît celulele B ce reacționează specific cu GGB, cît și pe cele care reacționează cu determinanții antigenici comuni. Ca urmare, sînt produși anticorpi care dau reacții atît cu antigenul tolerat originar, cît și cu proteina utilizată pentru imunizare.

S-a demonstrat că întreruperea stării de toleranță este favorizată cînd înrudirea dintre tolerogen și antigenul imunizant este relativ moderată, respectiv cînd au un număr critic de determinanți antigenici comuni sau înrudiți și un număr important de determinanți diferiți. Presupunînd că substanța tolerogenă are > 30 de determinanți antigenici și că organismul este tolerant față de șase dintre ei (ABCDEF), o substanță imunogenă cu epitopii DFGHIJ va determina producerea de anticorpi față de determinanții comuni D și F (reacție încrucișată 33%). Aceste date au fost verificate experimental: toleranța față de ASB poate fi întreruptă cu albumină serică de porc, om, cal și cobai, care dau reacții încrucișate în proporție de 30, 15, 15 și respectiv 6%. Albumina serică de oaie, care dă reacții încrucișate în proporție de 75%, este ineficientă. Necesitatea unor limite de înrudire încrucișată a fost confirmată și de cercetările cu conjugate haptenă — proteine. Imunizarea cu ASB conjugată cu o singură haptenă este ineficientă, spre deosebire de ASB substituită cu două haptene. Aceste cercetări au arătat că, în anumite limite, cu cît gradul de substituire cu haptene este mai mare, cu atît conjugatul haptenă — proteină este mai eficient în întreruperea areactivității.

Tratarea cu agenți citotoxici. Întreruperea stării de toleranță cu diferiți agenți (droguri sau agenți fizici) care produc moartea celulelor, în special, prin eliminarea celulelor T_S, a fost semnalată de mai mulți cercetători. Deși există și date contradictorii, Turk și colab. (1972) au semnalat posibilitatea întreruperii stării de toleranță mediată de celulele T_S prin tratare cu ciclofosfamidă, care are efect letal sau inhibitor selectiv față de aceste celule. Un fenomen similar a fost semnalat mai ales în cazul iradierii subletale a animalelor care prezintă stări de toleranță parțială.

Mecanismul acțiunii este necunoscut. Redobîndirea reactivității s-ar putea datora proliferării celulare compensatoare, care urmează iradierii, omorîrii celulelor T_S, eliberării de factori necesari unui răspuns imun normal sau unor mecanisme încă nedescoperite (Siskind, 1984).

Transferul de celule normale sau imune este în mod deosebit activ în toleranța indusă prin deleție clonală, deoarece asigură înlocuirea tipului de celule eliminate din organismul animalului tolerant. Este probabil fără efect în toleranța produsă de activitatea celulelor T_S. Billingham și Silvers (1961) au arătat că toleranța la homogrefe poate fi anulată prin transferul de limfocite provenite din ganglionii limfatici ai donatorilor normali sau, mai ales, de la animalele imunizate. Pe această cale nu poate fi însă suprimată toleranța față de antigene ce nu se multiplică (proteine sau hematii), care necesită, în plus, iradierea subletală anterioară transferului. După Siskind (1984) este probabil că, în aceste cazuri, supresia este indusă activ de celulele T_S sau poate de faptul că celulele transferate nu găsesc „spațiu" din cauza numărului prea mare de limfocite și nu pot persista în organismul-receptor.

Eliminarea tolerogenului se realizează prin administrarea pasivă de anticorpi sau de enzime degradative. Efectul este minor sau reprezentat de oarecare grăbire a apariției reactivității.

Alte mecanisme. Stările de areactivitate determinate de deleția clonelor de celule T_H pot fi întrerupte prin diferite mecanisme, teoretic posi-

bile, care „ocolesc" nevoia de aceste celule pentru un răspuns imun adecvat. Ele includ :

1) posibilitatea furnizării pe o cale alternativă a unui semnal produs, în mod normal, de celulele T_H, activ pe celulele B, fie direct, fie prin intermediul unui factor sintetizat de ele ;

2) stimulînd producerea, de către celulele T sau alte celule, a unui factor necesar pentru proliferarea și diferențierea celulelor B ;

3) deplasarea, printr-un mecanism necunoscut, a echilibrului dintre celulele T_H și T_S, în favoarea celor dintîi ;

4) elaborarea unor factori helper nespecifici ;

5) modificarea autoantigenelor la substanțe aparent străine, în urma combinării lor cu un medicament sau cu un constituent viral, care le conferă noi determinanți antigenici ;

6) activarea policlonală a celulelor B cu ajutorul virusurilor Epstein-Barr sau choriomeningitei limfocitare, al unor microorganisme (*Mycoplasma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* etc.), enzime (tripsina) sau substanțe chimice (dextran, lipopolizaharide, proteina A de la *Staphylococcus*, antibiotice (amfotericina B) etc. (Haeney, 1985). Un efect de acest tip a fost semnalat și în cazul reacțiilor grefă contra gazdă (efectul alogenic) sau al supernatantelor din culturile de limfocite mixte, care măresc răspunsul imun, prin stimularea limfocitelor T să producă factorii necesari pentru proliferarea altor celule T, precum și a limfocitelor B.

Celulele T supresoare

Existența unei categorii de celule T cu rol de atenuare a răspunsului imun a fost sugerată încă din anul 1969, de către Benveniste, Lespinats și Salomon, care au semnalat un fenomen considerat la acea dată paradoxal : șoarecii atimici și axenici produc mai multe molecule de IgG1 și IgG2 decît cei normali.

Descoperirea acestor celule a fost realizată de Gershon și Kondo (1970) în timp ce studiau toleranța imunitară indusă la șoarece față de hematiile de berbec. Ei au utilizat două loturi de șoareci singenici. Primul lot a fost iradiat, pentru a omorî toate celulele-stem, și, ulterior „reconstituit" prin administrare de celule timice și celule medulare (limfocite B), provenite de la animale singenice normale. Cel de-al doilea lot a fost supus timectomiei, pentru a distruge doar celulele T, după care i s-au administrat numai celule B. După imunizare cu cantități mari de hematii de berbec, animalele atimice produc anticorpi, deoarece în absența celulelor T, limfocitele B nu pot deveni tolerante. În schimb, cele cu sistemul imunitar integral reconstituit prezintă toleranță imunitară și nu produc anticorpi antihematii. Instalarea toleranței indică prezența unor celule capabile să suprime răspunsul imun, în loc să declanșeze efectuarea sau stimularea lui. Ceva mai mult, celulele splenice T tolerante pot transfera această stare după inoculare la un șoarece normal. De aceea, fenomenul este cunoscut sub denumirea de *toleranță imunitară infecțioasă* sau *mediată de celule* T_S.

Kerbel și Eidinger (1971) au confirmat rolul supresor al unor celule timice la șoarecele adult. Ei au demonstrat că îndepărtarea timusului determină creșterea sintezei anticorpilor față de antigenele T-independente de tipul polivinilpirolidonei, și au sugerat denumirea de *celule T supresoare* (T_S). Creșterea este suprimată dacă animalelor li se injectează timocite sau celule T de la animale singenice normale.

Alte cercetări și observații au confirmat aceste rezultate. Astfel, șoarecii aparținînd liniei genetice NZB (New Zealand Black) au, în general, o viață scurtă. Ei prezintă, după vîrsta de trei luni, fenomene de autoimunitate evidențiate prin anemie hemolitică, adenopatii, splenomegalie, formarea a diferite tipuri de autoanticorpi (frecvent antinucleari) și mor, consecutiv depunerii de complexe imune în rinichi. Fenomenele sînt determinate de sensibilitatea celulelor T_S la îmbătrînire. Dispariția lor permite proliferarea necontrolată a celulelor B și apariția consecutivă a autoanticorpilor, determinată de pierderea toleranței față de constituenții proprii. Berthold și colab. (1971) au arătat că șoarecii NZB bătrîni produc un răspuns imun intensificat față de polizaharidele de pneumococ tip III. Dacă li se injectează limfocite T de la animale tinere singenice, acest răspuns este inhibat, ca și evoluția anemiei hemolitice autoimune.

Limfocitele T_S sînt celule cu viață scurtă ce derivă din timocite sensibile la cortizon. Localizate în timus, foarte timpuriu după imunizare, și, ulterior, în splină, sînt caracterizate printr-o sensibilitate marcată la iradiere și la ciclofosfamidă. Au markeri distincți pe suprafața membranei. Cu toate acestea, sînt relativ greu de diferențiat *in vitro* de celulele T_C, fiind tot celule $T8^+$.

Au fost descrise două tipuri de celule T_S:

1) *celulele T_S specifice pentru antigen*, care reacționează numai cu antigenul corespunzător, suprimînd răspunsul imun exclusiv față de acesta;

2) *celulele T_S nespecifice pentru antigen*, care supresează răspunsul imun față de toate antigenele. Ele prezintă specificitate pentru idiotipurile Ig-anticorp și pentru receptorii limfocitelor T și B (Mota, 1986). În general, limfocitele T_S specifice pentru un anumit idiotip supresează producerea acestuia prin interacțiune directă cu celulele care produc și poartă idiotipul respectiv.

Celulele supresoare efectoare reglează activitatea sistemului imunitar, interacționînd cu macrofagele, cu celulele B și cu alte subpopulații de limfocite T, funcțional diferite. Au fost evidențiate și celule T_S cu memorie. În comparație cu alte categorii de celule T (T_H, T_A, T_C, T_{DH}) celulele T_S efectoare apar mai tardiv în cursul răspunsului imun. După Tada și colab. (1975), în stadiile timpurii ale acestuia, antigenele stimulează celulele T_H, care emit semnale de diferențiere a celulelor B și, după o perioadă de timp, pe cele de producere a celulelor T_S. Cînd acestea ajung în număr suficient de mare, efectul „helper" scade progresiv. Final, celulele T_S inhibă, printr-o buclă de retroacțiune, celulele auxiliare care le-a stimulat (Cantor și colab., 1975). Deși la șoarece a fost evidențiată o clasă de celule T_H care exercită efecte helper, fie pe celulele B, fie pe T_S, unii cercetători pledează pentru existența unei subclase specifice de celule T_H, numite T_{H-S}. Ele au proprietăți diferite de celulele T_H care „ajută" celulele B (T_{H-CMH} sau T_H—Ig).

Mecanismul acțiunii celulelor T supresoare nu este unitar, ci se realizează, uneori, cu diferențe majore, în funcție de sistemul studiat. Diferitele modele propuse, deși în mare măsură speculative, evidențiază totuși posibilitatea unor activități certe, ce se realizează direct sau, mai ales, prin intermediul factorilor supresori solubili pe care îi sintetizează. Astfel, rolul celulelor T_S în toleranța la self a fost, în general, subestimat, deși după mulți cercetători el este cert, mai ales în menținerea acestei stări. Nu este exclusă și contribuția posibilă a deleției celulelor T_H sau a altor tipuri de celule efectoare. Modificările sistemului imunitar corelate cu vîrsta și frecvența mai mare a bolilor autoimune la bătrîni pledează pentru necesitatea unui efect al celulelor T_S, menit să asigure menținerea toleranței la self. De asemenea, faptul că animalele cu deficit de celule T_S fac frecvent boli autoimune (șoarecii din linia NZB), este un argument semnificativ în favoarea rolului protector al acestora.

Celulele T_S sînt răspunzătoare de toleranța față de o serie de antigene T-dependente ca, de exemplu, hemocianina KLH sau gamaglobulina bovină, cînd aceste antigene sînt administrate în doze mari și sub formă neagregată. Ele pot fi, de asemenea, implicate în toleranța la doză mică, precum și în unele forme de hipersensibilitate de tip întîrziat. Astfel, administrarea intravenoasă de acid DNP-sulfonic la șoarece determină incapacitatea de a reacționa cu hipersensibilitate de contact. Starea specifică de toleranță poate fi transferată la un animal normal singenic, prin intermediul celulelor din splină sau din ganglionii limfatici de la șoarecele tolerant (Benacerraf, 1977).

Interacțiuni celulare și moleculare în cursul supresiei controlate de celulele T_S. Activitatea celulelor T_S, în cadrul circuitului imunitar implică intervenția a trei tipuri de interacțiuni descrise și în cazul celulelor T_H:

1) *Interacțiunea bazată pe recunoaștere* („Linked recognition") sau *pe înrudire* („Cognate interactions"; engl. „cognate" = asemănător ca origine, natură sau calitate; înrudit, descendent dintr-un strămoș comun). Acest tip corespunde situației în care interacțiunea a două celule, funcțional diferite, este condiționată de recunoașterea concomitentă a unor structuri moleculare diferite, situate pe suprafața aceluiași antigen. În cursul acestui proces, fiecare dintre celule „vede" determinanți antigenici diferiți (spre exemplu, în cazul conjugatelor haptenă — proteine, una din celule recunoaște haptena, iar cealaltă proteina-purtător). Efectul de reglare elaborat de una din celule este transmis celeilalte pe calea antigenului, care formează o punte între cele două celule ce interacționează (fig. 237). Alternativ, efectul poate fi mediat de factori specifici pentru antigen, produși de una din celulele de reglare și focalizați pe celula-țintă care leagă antigenul (Siskind, 1984; Tada, 1984).

2) *Interacțiunea bazată pe activarea policlonală sau nelegată de recunoaștere* („Unlinked recognition") este operantă în cazul în care una din celulele de reglare, stimulată specific de un antigen, produce mediatori nespecifici, cum sînt supresorii solubili ai răspunsului imun, factorul TRF („T replacing factor"), IL-2 etc. Aceștia acționează direct asupra situsurilor acceptoare ale celulelor-țintă. Interacțiunea este condiționată de exprimarea acestor situsuri-receptori pe suprafața celulei-țintă, care

este indusă fie de stimularea antigenică, fie de anumiți factori solubili (IL-1).

Deși efectul final al celulelor de reglare care interacționează prin acest mecanism este materializat în sinteza unor mediatori nespecifici, producerea lor este determinată de o etapă prealabilă de activare specifică, mediată de antigenul prezentat de macrofage și de celulele care prezintă antigenul, în general. Această etapă este supusă restricției CMH. Face excepție producerea de mediatori după stimulare nespecifică cu lectine și alți mitogeni.

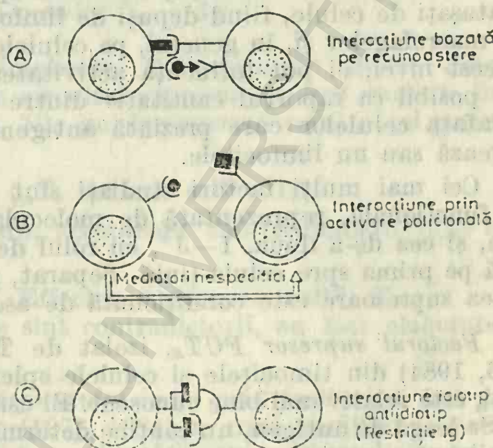


Fig. 237. – Tipurile de interacțiuni celulare în reglarea răspunsului imun. A. Interacțiunea bazată pe recunoaștere (pe calea unei punți de antigen). B. Interacțiunea fără recunoaștere specifică („Noncognate interaction"), sau activarea policlonală, produsă de mediatorii eliberați de una din celulele ce interacționează. C. Interacțiunea idiotip — antiidiotip, bazată pe restricție Ig (după Tada, 1984).

3) *Interacțiunea supusă restricției Ig sau idiotip — antiidiotip.* Ca și în cazul celulelor T_H, a fost descrisă existența unor celule T_S, care reglează răspunsul organismului pentru un anumit tip de structură a Ig. Ele funcționează ca limfocite T_S specifice, care controlează producția anticorpilor, avînd un anumit idiotip — alotip sau izotip. Procesul este deci asigurat de o categorie specializată de celule T_S, care recunosc Ig sau structuri înrudite cu Ig, situate pe suprafața celulelor-țintă. Ele sînt denumite *celule T_S specifice pentru imunoglobuline* (IgT_S).

Mecanismul de reglare cu specificitate pentru idiotip este evident în modelul „activării lineare" a celulelor bazat pe recunoașterea idiotipului (fig. 240) descris de Benacerraf (1980). În acest model, o celulă supresor inductoare (T_S1), activează o celulă T_S2 (antiidiotipic), care, la rîndul său, activează o a treia celulă T_S3 idiotip pozitivă. Sistemul este declanșat de un semnal inițiator care perturbă echilibrul celular (Siskind, 1984).

Factorii supresori. Multiplicității celulelor T_S implicate în reglarea răspunsului imun în anticorpi îi corespunde intervenția mai multor mediatori, capabili să transmită semnale de la o celulă la alta, intervenind în diferite etape ale circuitului supresor de reglare.

Existența factorilor solubili produși de celulele T a fost semnalată de Feldmann (1972), precum și de Tada (1974). Ei au demonstrat că funcția unor celule T poate fi înlocuită de supernatantul culturilor de celule care conține factorii eliberați în mediu. Taussig (1974) a evidențiat existența la șoarece a două categorii de celule și respectiv de factori activi. Supernatantul culturilor de celule stimulate cu antigene polipeptidice conține în primele 6—8 ore un factor care injectat la șoarecii normali stimulează producerea de anticorpi de către celulele B. Supernatantul recoltat mai tîrziu, injectat la șoarece, inhibă răspunsul imun precedent.

Factorii supresori sînt ușor detectabili prin evidențierea activității lor, dar greu de izolat și purificat. După Tada (1984), ei sînt în general atașați de celule, fiind depuși de limfocitele care migrează pe suprafața macrofagelor și, în general, pe celulele care prezintă antigenele. De la acest nivel, ei pot influența activitatea celulelor efectoare specifice. Este posibil ca raportul cantitativ dintre factorii helper și supresori pe suprafața celulelor care prezintă antigenele să determine dacă acestea activează sau nu limfocitele.

Cei mai mulți factori studiați sînt alcătuiți din două molecule: una funcțională, reprezentată de molecula $I-J^{-}$, cu activitate supresoare, și cea de-a doua, $I-J^{+}$, cu rolul de catenă-purtător, care focalizează pe prima spre celula-țintă. Separat, nici una nu este activă. Activitatea supresoare este condiționată de asocierea lor (Yamauchi, 1982).

Factorul supresor FCT_S, izolat de Tada, Taniguchi și Fakemori (1976, 1984) din timocitele și celulele splenice ale șobolanilor hiperimunizați, este relativ mai bine cunoscut. El este o proteină cu g.m. $<70\,000$ dal. Se leagă de antigen, nu conține determinanți de tip Ig convenționale și inhibă răspunsul în anticorpi, într-un mod strict specific pentru antigen. Aceiași cercetători, utilizînd un sistem experimental mai adecvat, au izolat un factor similar de la șoarecele hiperimunizat. Acesta poartă determinanți codificați de subregiunea I — J a complexului CMH (H-2) de la șoarece și produce supresie eficientă după legarea pe celulele T amorsate de antigen.

Studiul factorilor produși de celulele T_S provenite de la om, șoarece, maimuță și cîine a demonstrat că ei aparțin, ca activitate, la două categorii majore: unii sînt factori inductori, iar ceilalți efectori. Deși mecanismul acțiunii lor a fost studiat în mai multe sisteme de supresie, el este relativ puțin cunoscut. Datele obținute au permis totuși elaborarea a două modele experimentale corespunzînd supresiei *in vitro* și *in vivo*.

Circuitele de reglare a supresiei imunitare. Supresia răspunsului imun este un proces complex realizat prin participarea mai multor tipuri de celule T și a unor factori specifici și nespecifici. Activitatea lor este fie independentă, fie expusă unor restricții genetice, impuse de genele CMH sau de cele pentru regiunile V_H ale Ig. Semnalul antigenic inițial declanșează un proces secvențial, în care mesajele sînt purtate de la un tip de celulă la altul, pentru a realiza efectul supresor final. În ansamblu, acest mecanism complicat de reglare, prevăzut cu bucle de feedback pozitiv și negativ, care intervin în anumite puncte critice pe parcursul desfă-

şurării lui, constituie *circuitul imunologic* („Immunological circuit") (Cantor şi Gershon, 1979, 1980).

După Tada (1984), între conceptul de reţea imunitară, formulat de Jerne (1974), şi cel de circuit, există deosebiri majore. Reţeaua implică reglarea mediată de domeniile variabile ale imunoglobulinelor, indiferent de tipul celulelor pe care aceste molecule sînt exprimate. Circuitul imunitar implică, în primul rînd, comunicarea dintre diferite tipuri de celule, indiferent de dispozitivele de interacţiune pe care le utilizează. Fiecare tip de celulă participantă în circuitul de comunicare exprimă markeri de suprafaţă caracteristici, asociaţi cu funcţii determinate genetic. Interacţiunile dintre celulele constitutive ale circuitului sînt supuse, după caz, fie restricţiei CMH, fie celei a genelor V_H — Ig.

Tipurile de celule T_S implicate. Interacţiunile dintre diferitele tipuri de celule participante în circuitul supresor au fost studiate în mai multe sisteme experimentale. Ele au demonstrat rolul a cel puţin trei tipuri de celule T_S:

1) Celule T_S inductoare („T_S inducer cell") T_{Si}.

2) Celule T_S transductoare, acceptoare sau reglatoare („T_S transducer cell").

3) Celule T_S efectoare („Effector suppressor cell") T_{Se}.

Deşi multe din rezultate sînt contradictorii, au fost elaborate mai multe modele experimentale.

Modelul de supresie a răspunsului imun prin feedback a fost propus de Eardley, Gershon şi Green (1978, 1984) în urma studiilor asupra toleranţei induse *in vitro*, faţă de hematiile de berbec. El implică punerea în funcţiune a circuitului supresor, prin interacţiuni celulare mediate de factori supresori solubili.

În acest model (fig. 238 A), iniţial, antigenul activează celulele inductoare (T_{Si}), care au fenotipul Lyt-1^+, 2^-, Qa-1^+ I—J^+. Ele sînt asemănătoare celulelor T_H, sub raportul exprimării markerului fenotipic Lyt-1^+ şi al capacităţii de a induce intervenţia unui al doilea tip de celule. Celulele T_{Si} activate sintetizează un factor supresor inductor, FT_{Si} sau $FT_{S}1$, alcătuit din două molecule distincte. Una dintre ele este specifică pentru antigen şi conferă specificitate acţiunii sale. Cea de-a doua este molecula I—J, nespecifică pentru antigen, codificată de gene situate în subregiunea H-2 a CMH la şoarece.

Factorul inductor acţionează asupra celulelor T_S acceptoare (amplificatoare) sau transductoare, definite de Gershon drept celule programate să accepte şi să transmită semnalele primite de la celulele inductoare. Ele au fenotipul Lyt-1^+, 2^+, 3^-, I—J^+, Qa-1^+.

Deşi factorul T_{Si} poartă determinanţi I—J, acţiunea sa nu este supusă restricţiei CMH, ci, în mod paradoxal, acţionează numai pe celule transductoare, care au gene comune pentru regiunea V_H a Ig cu celula T_{Si} care l-a produs. După acceptarea semnalului, celula transductoare activează a treia categorie de celule supresoare efectoare preexistente. După Tada (1984), este posibil ca limfocitul T_S acceptor să se diferenţieze, pentru a dobîndi rolul de celulă efectoare.

Final, celula T_{Se} inhibă funcția limfocitelor T_H și a celulelor T_S inductoare proprii circuitului respectiv. De aici, denumirea de *supresie prin feedback* dată acestui model („Feedback suppression"). Celulele T_{Se} au fenotipul Lyt-1^-, 2^+, 3^-, I—J^-, Qa-1^-. Ele acționează prin interme-

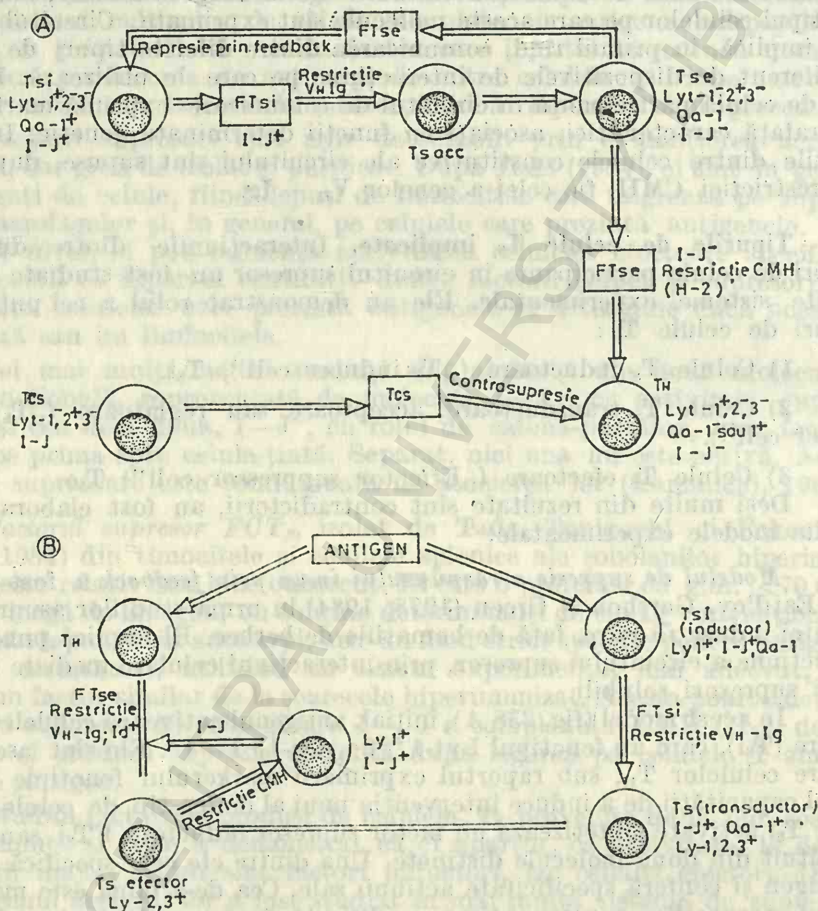


Fig. 238. — Supresia răspunsului imun. A. Circuitul de reglare a supresiei, activ în cursul răspunsului imun primar în anticorpi antihematii (după Gershon, modificat de Tada, 1984). B. Supresia prin feedback a răspunsului imun. Este evidențiată cascada interacțiunilor ce duc la celula T_S efectoare, markerii de suprafață ai celulelor participante și restricțiile acțiunii lor.

diul unui al doilea factor specific pentru antigen, factorul T_S efector Lyt-2^+. Deși nu poartă determinanți I — J, activitatea lui asupra celulelor T_H și T_{Si} este supusă, după Tada (1984), restricției CMH.

Recent, Male, Champion și Cooke (1987) prezintă o variantă nouă, a acestei etape finale. Modificarea propusă (fig. 238 B) se bazează pe posibilitatea ca limfocitele T_{Se} să producă numai o catenă a factorului supresor efector și anume cea specifică pentru antigen. Acesta acționează asupra

unei *celule auxiliare* (Lyt-1$^+$, I—J$^+$), printr-un mecanism supus restricției CMH, stimulînd-o să-i furnizeze o moleculă nespecifică de I—J. Aceasta ar fi absolut necesară pentru a asigura funcția factorului T_S efector (în absența ei activitatea acestuia ar fi nulă). Final, factorul efector și-ar exercita activitatea asupra celulelor T_H, printr-o interacțiune bazată pe restricția V_H—Ig. Nu se știe dacă acest mecanism este operant și *in vivo*.

Activarea lineară a căilor de supresie bazată pe interacțiuni idiotip—antiidiotip. Una dintre modalitățile teoretic posibile de acțiune a celulelor T_S este în cadrul rețelei idiotipice a sistemului imunitar (vezi cap. „Teoria rețelei idiotipice a sistemului imunitar"). Ea se bazează pe ideea că structurile idiotipice de pe suprafața celulelor T reglatoare și/sau de pe factorii lor ar putea acționa ca elemente de ghidare într-un circuit supresor, ce evoluează în mai multe etape. După Feldmann (1974, 1985), receptorii T se comportă în organism ca orice antigen. Ei sînt recunoscuți ca atare de alte celule ale sistemului imunitar, care au receptori complementari. Ca și în cazul Ig, receptorul T care joacă rol de antigen este un idiotip. Ca urmare, celula care îl poartă va fi recunoscută de altă celulă, care poartă un antiidiotip. În felul acesta se realizează o recunoaștere în lanț, care are ca efect faptul că producerea de celule T_H (T_{H-S}) poate duce la apariția de celule T_S efectoare, care, la rîndul lor, pot recunoaște și supresa sau măcar inhiba celulele T_H (fig. 239).

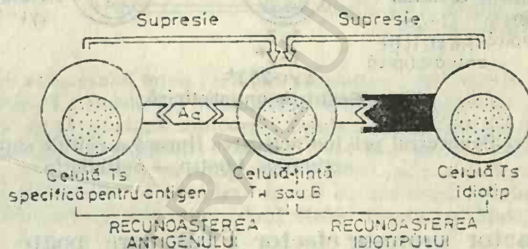


Fig. 239. — Rolul celulelor T_S în supresia răspunsului imun. Celulele T_S specifice pentru antigen reacționează cu celulele T_S sau B, prin intermediul unei punți de antigen. Celulele T_S specifice pentru idiotip se fixează direct pe receptorii celulelor-țintă în absența antigenului.

Modelul lui Benacerraf (1980), bazat pe această concepție, a fost elaborat în cursul cercetărilor referitoare la reglarea răspunsului imun față de haptena azobenzen arsonat (ABA), după cuplare pe celulele splenice de șoarece (fig. 240).

Inițial, antigenul este prezentat unor celule precursoare pre-T_S1, într-un mod controlat de restricția CMH, inducînd, prin activarea acestora, apariția celulelor T_S1. Acestea au fenotipul Lyt-1$^+$, 2$^-$, 3$^-$, I—J$^+$, sînt idiotip (Id) pozitive, specifice pentru antigen și sensibile la ciclofosfamidă. După Tada (1984), celulele T_S1 sînt, probabil, echivalente celulelor T_Si din alte sisteme. Ele poartă, după Benacerraf (1980), un idiotip capabil să reacționeze încrucișat cu anticorpii anti-ABA. Celulele T_S1

produc un factor supresor care poartă idiotipul I—J$^+$ și un situs de legare a antigenului. Activitatea factorului T_s1 este supusă restricției genelor V_H—Ig.

El stimulează celulele pre-T_s 2 (Lyt-1$^+$, 2$^+$), pentru ca să devină celule T_s2. Acestea au fenotipul Lyt-1$^-$, 2$^+$, 3$^+$, I—J$^+$ și poartă determinanți antiidiotipici. Celulele T_s2 sînt, probabil, echivalente celulelor T_se.

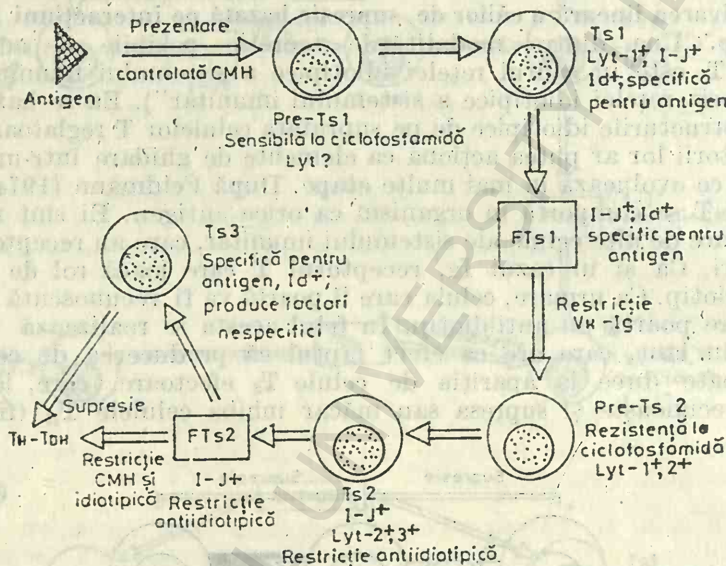


Fig. 240. — Modelul lui Benacerraf privind activarea lineară a căii de supresie, pe calea interacțiunilor idiotip — antiidiotip.

Ele produc un factor supresor efector FT_s2, care poate interacționa cu celulele T_H și T_{DH}, fie direct, fie prin intermediul unor celule T_s, denumite T_s3. Acestea sînt specifice pentru antigen, idiotip pozitive și își exercită acțiunea prin intermediul unor factori supresori nespecifici.

Datele prezentate sugerează existența unor interconexiuni între circuitele de reglare dirijate de celulele T_s și rețeaua idiotipică a răspunsului imun, deși mecanismul exact nu este cunoscut. Fig. 241 propune un model simplificat de reglare, elaborat de Roitt, Brostoff și Male (1986).

Limfocitele contrasupresoare și contrasupresia

Green și colab. (1981) au emis cei dintii ideea că declanșarea răspunsului imun necesită intervenția unei subpopulații limfocitare distincte, cu rolul de a face celulele T_H rezistente față de activitatea inhibitoare („Down regulation") a celulelor T_s. Fenomenul a fost denumit *contrasupresie*, iar după Kruiff și colab. (1981), „*abrosuppression*" (de la abrogare). În absența contrasupresiei, starea normal supresată a siste-

mului imunitar persistă și după administrarea substanțelor imunogene, deoarece celulele T_H nu pot fi activate. Fenomenul a fost semnalat inițial la nivelul sistemului imunitar al mucoaselor (GALT și BALT), unde celulele efectoare sînt în număr mare. El pare să fie general, deoarece între timp a fost întîlnit în mai multe localizări, la om și la șoarece.

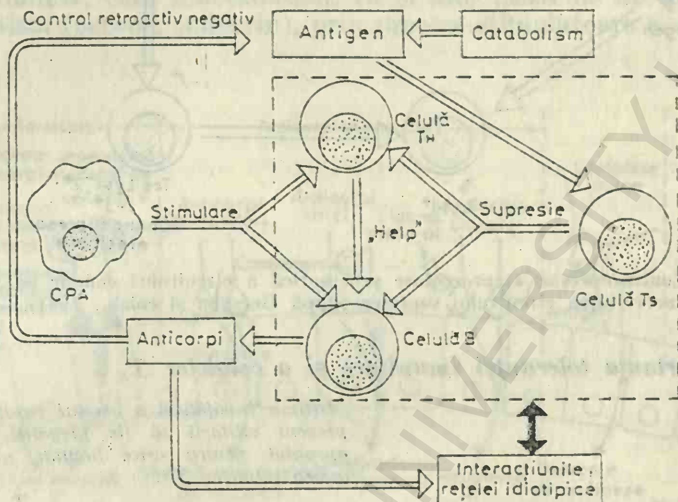


Fig. 241. — Reglarea răspunsului imun : schemă simplificată de inhibare retroactivă prin anticorpi și rețeaua idiotipică. Celulele T_H stimulate de antigenul prezentat de celulele „accesorii" (CPA) ajută celulele B să producă anticorpi. Celulele T_S stimulate de antigen controlează celulele T_H și B. Anticorpii și receptorii celulelor T specifice pentru idiotip controlează activitatea celulară legată de recunoașterea antigenului (cadrul marcat cu linie întreruptă). Catabolismul antigenului și legarea lui în complexe imune cu anticorpii diminuă efectul său stimulator în răspunsul imun (după Roitt, Brostoff și Male, 1985).

Celulele contrasupresoare sînt limfocite T (T_{CS}), care poartă antigenele de suprafață Ly-t2^+, I$-$J$^+$. Au putut fi izolate în număr mai mare din splina animalelor hiperimunizate pe baza proprietății lor de a lega lectina din măzăriche (*Vicia villosa*). Primele observații sugerează că nu părăsesc locul de întîlnire cu antigenul și nu pătrund și nici nu acționează în circulația periferică.

Cunoștințele actuale asupra markerilor, antigenelor de suprafață, ca și asupra biologiei lor sînt foarte limitate. Se presupune că în organism ar exista un circuit celular de contrasupresie, analog celui descris în cazul celulelor T_S. El ar implica, de asemenea, participarea a trei categorii de celule T_{CS} : inductoare, de reglare sau transductoare și efectoare. Rolul lor ar fi de a contracara activitatea circuitului supresor (fig. 242).

Scăderea activității celulelor T_{CS} favorizează toleranța imunitară (Green și Gershon, 1983). În stările hiperimune, celulele T_{CS} conferă limfocitelor T_H rezistență funcțională de supresie.

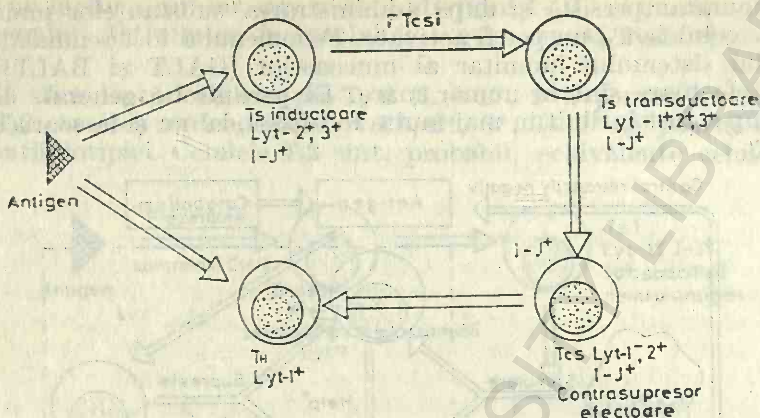


Fig. 242. — Contrasupresia. Reprezentare schematică a circuitului celular ce contracarează activitatea circuitului supresor (după Gershon și colab., 1981).

Importanța toleranței imunitare și a celulelor T_S

„Ultima învățătură a acestui capitol este de a preveni cititorii să fie pregătiți, în viitorul apropiat pentru orice noutate neașteptată în lumea celulelor T".

T. TADA

Toleranța la self este un fenomen cu importanță esențială, apărut ca un mecanism natural de apărare, cu rolul de a proteja constituenții celulelor și ai țesuturilor proprii organismului de agresiunea celulelor sistemului imunitar. Evoluînd ca primă particularitate fundamentală a sistemului imunitar, în paralel cu funcția diametral opusă (capacitatea de recunoaștere specifică a substanțelor nonself), ea asigură existența propriilor celule și țesuturi, creșterea și dezvoltarea organismului, în timp ce reacțiile față de substanțele sau celulele nonself determină respingerea rapidă sau neutralizarea celor străine.

Mecanismele care o condiționează sînt multiple și relativ puțin cunoscute. Ele pot acționa independent sau asociat și sinergic pentru a o induce și/sau menține. Unele dintre ele au apărut în cursul evoluției, probabil ca mecanisme speciale adaptative pentru producerea areactivității la self (deleția clonală, inactivarea funcțională sau amnezia clonală etc.) Altele (celulele T_S, anticorpii antiidiotip, rețeaua idiotipică etc.) par să fie mecanisme normale de reglare, care funcționează la animalele tolerante cu rolul de a menține răspunsul imun la un nivel neobișnuit de scăzut.

Pierderea toleranței la self poate determina apariția unor boli autoimune, adesea cu consecințe extrem de grave, ireversibile, decurgînd din agresiunea anticorpilor, celulelor citotoxice, celulelor killer (K) ș.a. asupra propriilor celule (fig. 243).

Celulele T supresoare au, pe lîngă rolul esențial de menținere a toleranței la self, un rol, de asemenea, cu importanță majoră, de mecanism

de control negativ în reglarea amplitudinii răspunsului imun. Ele reprezintă o populaţie de limfocite apărute foarte timpuriu în filogenie, în raport cu celulele T_H, dovadă şi prezenţa lor predominantă numeric în stadiile precoce ale ontogeniei (Basten, 1975). Împreună cu celulele T_H şi factorii lor solubili, ajutători şi supresori, asigură controlul homeostatic al sistemului imunitar, care funcţionează, ca şi alte „sisteme de comunicare" din organism (nervos, endocrin), prin procese stimulatoare şi inhibitoare.

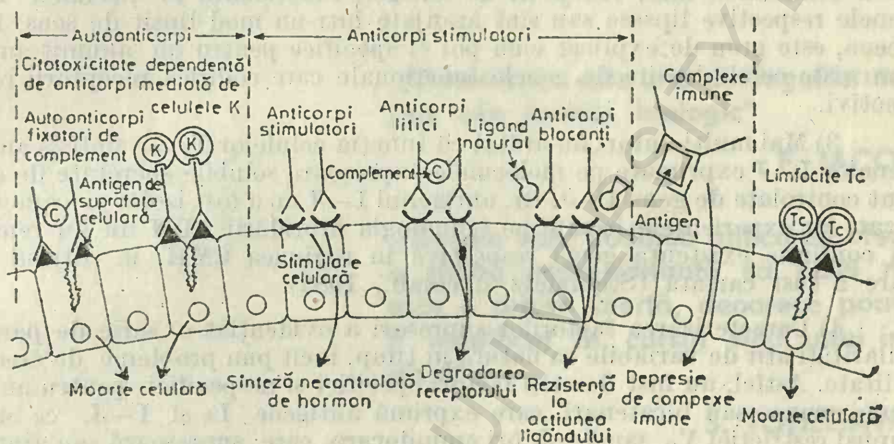


Fig. 243. — Reprezentare schematică a mecanismelor efectoare răspunzătoare de particularităţile caracteristice bolilor autoimune (după Haeney, 1984).

Rolul esenţial al celulelor T_S în reglarea răspunsului imun şi în toleranţa imunitară este reflectat şi de faptul că activitatea lor anormală determină apariţia unor stări patologice. Astfel, activitatea lor redusă poate favoriza apariţia unor boli autoimune sau stări alergice. Activitatea excesivă determină boli prin deficit imunitar şi poate favoriza apariţia unor forme de neoplazii. Înţelegerea mecanismelor ce stau la baza toleranţei imunitare, a imunosupresiei, în general, şi a activităţii celulelor T_S are o importanţă deosebită pentru controlul reacţiilor de respingere a transplantelor de ţesuturi şi organe, pentru prevenirea şi controlul bolilor autoimune şi alergice, ca şi pentru prevenirea şi controlul unor neoplazii, prin eliminarea selectivă a unor reacţii imunitare nedorite, care ar putea amplifica creşterea tumorală.

★

Recent, într-o analiză critică a problemei celulelor T_S, Möller (1988) îşi manifestă scepticismul privind existenţa unei subpopulaţii distincte de celule de acest tip, deşi numai după anul 1980 le-au fost consacrate peste 4 500 de publicaţii. În sprijinul tezei sale, invocă o serie de argumente majore :

1) Separarea limfocitelor se face pe baza markerilor de suprafaţă CD4 (T4) şi CD8 (T8) în două mari categorii, limfocite T_H şi T_C/T_S. Aceste

date demonstrează că nu există nici un marker specific pentru celulele T_S și, ca urmare, denumirea lor este incorectă. Termenul corect este T_C/T_S. Celulele T_S nu pot fi identificate cu anticorpi monoclonali și nimeni nu le-a izolat ca o populație pură.

2) Genele care codifică receptorul de antigen T nu funcționează în celulele descrise ca T_S (Kronberg, 1985). Spre deosebire de celulele T_H și T_C, în care informația genetică este rearanjată într-un mod care asigură codificarea unor receptori de antigen funcționali, în „celulele T_S" genele respective lipsesc sau sînt aranjate într-un mod lipsit de sens. De aceea, este greu de explicat cum pot fi specifice pentru un anumit antigen niște celule lipsite de genele funcționale care codifică receptorii respectivi.

3) Mai mulți autori au arătat că funcția celulelor T_S și sinteza antigenelor I—J exprimate pe moleculele supresoare solubile secretate de ele sînt controlate de gena I—J. Or, antigenul I—J nu a fost izolat și caracterizat, iar experiențele bazate pe tehnologia hibridării ADN nu au reușit să confirme existența genei respective în regiunea CMH, în situsul în care a fost cartată (Steinmetz și colab., 1982).

4) Caracterizarea factorilor supresori a evidențiat o serie de particularități atît de variabile ca natură în timp, încît pun probleme de credibilitate. Astfel, au fost descriși factori specifici și nespecifici pentru antigene, mono- sau bicatenari, care exprimă antigene Ia și I—J, ce sînt supuși restricției V_H sau I—J, ori amîndorura, care supresează sau ajută, în funcție de faptul că sînt glicozilați sau nu.

5) Se adaugă o serie de incertitudini legate de unele funcții esențiale ca : specificitatea pentru antigen, restricția CMH, natura exactă a celulelor-țintă, frecvența celulelor reactive, mecanismul de acțiune.

6) Descrierea celulelor T contrasupresoare și a celulelor „veto" („Veto cells"), și ele caracterizate ambiguu, a accentuat această stare de incertitudine :

7) În sfîrșit, după Möller, însăși modelele schițate pentru explicarea interacțiunilor complexe dintre celulele T_S inductoare, transductoare și efectoare, implicînd contacte directe intercelulare sau sinteza și eliberarea de factori solubili, pun probleme de credibilitate.

Toate aceste date incerte s-ar datora faptului că metodele de studiu al celulelor T_S sînt mai puțin precise și mai puțin capabile de cuantificare a diferitelor particularități, în comparație cu cele disponibile pentru celulele T_H și T_C. Lucrarea lui Möller este în contradicție evidentă cu cele mai multe date publicate anterior, care pledează pentru funcția imunitară esențială a celulelor T_S în procese fundamentale ca : reglarea discriminării self — nonself printr-un echilibru delicat între celulele T_S și celulele T și B potențial autoreactive, reglarea și modularea răspunsului imun, ca și în patologia imunitară (alergii, autoimunitate, imunodeficiențe etc.).

IMUNOGENETICĂ ȘI EVOLUȚIE

„Diversitatea este una din regulile majore ale jocului biologic"

F. JACOB

„Genele care codifică anticorpii oferă o probă impresionantă că ADN nu este o arhivă inertă, deoarece poate fi modificat în cursul vieții unui individ"

S. TONEGAWA

„Șeful de orchestră al răspunsurilor imune este un complex genetic"

P. TRUFFA-BACHI
C. LECLERC

„Cîteva sute de elemente genetice permit fabricarea a sute de milioane de anticorpi diferiți, așa cum cu cele 26 de litere ale alfabetului pot forma zeci de mii de cuvinte, care combinate între ele formează o infinitate de fraze"

S. TONEGAWA

„Evoluția biologică este bazată pe un fel de bricolaj molecular, pe reutilizarea constantă a vechiului pentru a face nou"

F. JACOB

Bazele genetice ale diversității anticorpilor

„Proteinele care recunosc invadatorii străini sînt cele mai diverse proteine cunoscute. Ele sînt codificate de sute de fragmente de gene dispersate, care pot fi combinate în milioane sau miliarde de căi diferite".

Susumu Tonegawa

Sistemul imunitar al vertebratelor are o capacitate virtual nelimitată de a produce anticorpi diferiți, care recunosc și leagă specific multe milioane de substanțe antigenice sau molecule nonself. În general, numărul tipurilor diferite de anticorpi este estimat între ~ 10^8 (Hood și colab., 1984), 10^9 (Tonegawa, 1985) și respectiv 10^{10} (Urbain, 1987).

Inițial s-a considerat că Ig ar fi sintetizate de celulele care produc globuline normale și, ca urmare, ar fi formate din proteine identice. Unicitatea lor structurală ar rezulta din conformația lor spațială diferită, determinată de prezența antigenului. Teoriile instructive, în diferitele lor variante (Alexander, 1931; Breinl și Haurowitz, 1938, 1952; Mudd, 1939; Pauling, 1940), atribuiau un rol esențial grupării determinante de specificitate a antigenului care, pătrunzînd în celulele formatoare de anticorpi, acționau ca un tipar sau matriță („template") pentru a imprima polipeptidelor, pe cale de sinteză, o configurație spațială complementară. Acest mecanism explica specificitatea reacției antigen — anticorp, ca rezultat al „potrivirii" perfecte între matriță și „amprenta" sa. Teoriile instructive au fost infirmate de demonstrarea diversității structurale imense a Ig și de faptul că fiecare celulă B și descendenții săi produc numai un singur tip de anticorp. Conceptual, Burnet (1959) considera că sistemul imunitar este reprezentat de familii de limfocite care poartă pe suprafață receptori identici de antigen, a căror specificitate este determinată genetic. Epitopii antigenelor complexe selectau, din această colecție imensă, acele clone care aveau receptori complementari și le determinau să prolifereze și să se diferențieze în celule efectoare. Anticorpii produși de limfocitele B diferențiate sînt identici ca specificitate cu receptorul legat de celulele ce aparțin clonei precursoare.

Conform postulatelor de bază ale biologiei moleculare, potențialului unui organism de a sintetiza milioane de tipuri de anticorpi diferiți ar trebui să-i corespundă prezența unui număr egal de gene, cu funcția de a le codifica. Teoriile care au încercat să explice această problemă, deși infirmate, rămîn interesante pentru că, elemente din fiecare, sînt regăsite în concepția actuală, bazată pe date concrete experimentale.

Modelul diversității embrionare. *Teoria liniei germinale* („Germ-line theory"), în varianta formulată de Hood și Talmage (1970), („modelul diversității embrionare"), consideră că genele structurale care codifică toate regiunile V_L și V_H pe care le poate sintetiza un organism sînt pre-

zente în celula germinală. În felul acesta, informaţia genetică privind întreaga diversitate a Ig ar fi înscrisă în genomul fiecărui individ, sub forma unui număr imens de cistroni şi transmise ereditar exact ca pentru celelalte proteine. Ea s-ar fi format în cursul evoluţiei vertebratelor, prin mecanisme convenţionale ca duplicări, mutaţii, recombinări şi selecţie. Sub raport cantitativ, se consideră că ADN genomic al vertebratelor ar putea include numărul de gene necesar pentru a codifica 10^7—10^8 tipuri diferite de Ig, fără probleme speciale (Eisen, 1976).

Obiecţiile cele mai importante sînt de ordin teoretic, pentru că, în general, păstrarea şi diversificarea genelor în cursul evoluţiei este bazată pe selecţia celor cu valoare pentru supravieţuire şi pierderea celor inutile. Este greu de imaginat cum au apărut genele V pentru antigene care n-au existat niciodată în trecutul speciei (de exemplu, antigenele sintetice) şi cum s-au putut păstra atîtea gene, neutilizate în cursul evoluţiei.

Teoria recombinărilor somatice postulează existenţa unui număr limitat de cistroni V în linia germinală, compatibil cu problemele de coevoluţie a genelor. Diversificarea s-ar realiza prin recombinări somatice între un număr, uneori foarte limitat, de cistroni germinali, asociate cu diviziunile celulare. Antigenele ar acţiona în procesul de selecţie a recombinanţilor.

După unele *teorii mixte* (Edelman şi Gally, 1967), diversitatea Ig ar fi parţial înscrisă în linia germinală (prin prezenţa a ~ 100 de cistroni) şi puternic amplificată prin recombinări somatice, în cadrul grupelor de translocaţie. Variabilitatea indusă de un astfel de model este teoretic considerabilă.

Teoria mutaţiilor somatice (Milstein, 1970 ; Cohn, 1974) consideră că repertoriul genelor pentru Ig este construit *de novo*, în fiecare individ, în cursul dezvoltării sistemului imunitar, pornind de la un număr mic de gene în linia germinală, prin mutaţii la nivelul celulelor somatice. Rezultă apariţia unui număr foarte mare de clone diferenţiate de celule imunocompetente, care diferă prin natura genelor V şi deci prin capacitatea lor de a produce Ig diferite. Mecanismul este compatibil cu prezenţa unui repertoriu imunologic diferit la diferiţii indivizi şi cu lipsa eredităţii mendeliene a exprimării lui.

Deşi, după Eisen (1976), diversificarea s-ar putea realiza fără necesitatea intervenţiei unei hipermutabilităţi, este greu de explicat acumularea unui număr atît de mare de gene diferite, în cursul unei perioade scurte, cum este cea dintre fertilizarea oului şi dobîndirea competenţei imunologice de către embrioni.

Pentru selecţia celulelor mutante, din masa extrem de mare de celule, cu gene V neschimbate, au fost propuse două ipoteze :

1) Selecţia pozitivă (Cohn, 1974) s-ar face sub influenţa antigenului, care selecţionează şi stimulează proliferarea celulelor mutante, ce produc regiunea V corespunzătoare (complementară) lor. Teoria presupune prezenţa şi persistenţa în organism a unui număr mare de antigene, pe toată durata vieţii organismului, ceea ce este improbabil.

2) Selecţia negativă (Jerne, 1971) consideră că selecţia ar acţiona în favoarea mutaţiilor localizate în regiunile hipervariabile, care deter-

mină specificitatea Ig, fără să necesite prezența antigenelor. Mecanismul s-ar realiza prin supresia celulelor care exprimă gene cu acțiune antiself, cu alte cuvinte ar favoriza supraviețuirea tuturor celulelor ce suferă mutații în gena V, dacă codifică Ig specifice pentru orice antigene diferite de cele proprii.

Ipoteza lui Dreyer și Bennett (1965) are la bază premisa că în explicarea sursei genetice a diversității trebuie să se țină seama de particularitățile de structură ale anticorpilor. Ideea unei gene unice pentru regiunile V și C ale Ig este improbabilă și lipsită de orice rațiune biologică. Indiferent dacă diversitatea apare în filogenie (teoria liniei germinale) sau în ontogenie (teoria mutației somatice), variația extremității NH_2 terminale a catenei polipeptidice și menținerea neschimbată a extremității COOH terminale pun o problemă insolubilă din punctul de vedere al biologiei moleculare: nu se cunoaște nici un mecanism care, în cursul evoluției, ar fi putut păstra invariantă secvența de ADN corespunzătoare regiunii C, în timp ce cealaltă (V) ar fi fost expusă unor mutații frecvente.

Singura modalitate plauzibilă era, după Dreyer și Bennett, codificarea moleculelor de Ig-anticorp de către mai multe gene separate în celulele embrionare, care s-ar asocia la întîmplare, în cursul diferențierii și maturării celulelor B. Un anticorp funcțional s-ar forma ori de cîte ori recombinarea genetică aduce, în celula precursoare a plasmocitelor, o genă V în apropierea genei C respective. În felul acesta, s-ar forma genele V_LC_L și V_HC_H funcționale, corespunzătoare celor două tipuri de catene polipeptidice. Teoretic, repertoriul imens de Ig diferite poate fi realizat prin recombinarea unui număr mare de gene V, cu un număr mic de gene C.

Modelul propus este considerat ca o variantă a teoriei liniei germinale și stă la baza teoriei recombinării în linia germinală („Recombinational germ line theory") (Korsmeyer și Waldmann, 1984). El are avantajul că dă o explicație naturală modului în care Ig pot avea o regiune a moleculei variabilă și alta constantă și de utilizare eficientă, cu maximă economie de informație a genomului lor.

Cu toate acestea, ipoteza nu a fost acceptată, întrucît era în contradicție cu unele dogme ale biologiei moleculare, după care: 1) relația „o genă — un polipeptid" era considerată ca un principiu universal valabil; 2) genomul este și rămîne constant pe toată durata dezvoltării unui organism; 3) rearanjarea genelor într-o celulă somatică era neadmisă ca mecanism; 4) informația genetică era considerată ca avînd un caracter continuu și nu discontinuu, cum sugera, pentru prima dată, această ipoteză.

Prima confirmare a ipotezei lui Dreyer și Bennett a fost adusă de Leder și Swan (1971), folosind tehnica dineticii de hibridare * pentru a

---

* Tehnica se bazează pe capacitatea de hibridare a moleculelor „sonde" de ARNm sau ADNc (produs cu ajutorul transcriptazei inverse) marcate radioactiv de a hibrida cu secvențele complementare din structura genomului celular. Viteza cu care o „sondă" de ARNm sau ADNc radioactiv „găsește" secvențele complementare și se hibridează cu ele (cinetica de hibridare) este o măsură indirectă, dar eficientă, a numărului de molecule complementare din preparat.

„numără" segmentele de ADN care codifică la şoarece catena uşoară k (L_K). Ei au demonstrat că atît în celulele embrionare, cît şi în celulele de mielom, ADN conţine o singură genă pentru regiunea constantă (C) şi mai multe gene pentru regiunea variabilă (V).

Ulterior, Tonegawa şi Hozumi (1976, 1978) au demonstrat că aranjamentul genelor care codifică lanţul L este diferit în celulele embrionare faţă de celulele mature. Ei au secţionat în segmente reproductibile ADN total din celulele embrionare de şoarece şi din celulele de mielom (care produc anticorpi monoclonali). Au arătat că secvenţele V_L şi C_L sînt situate foarte îndepărtate în celulele embrionare, în timp ce în celulele mature, care produc anticorpi, sînt foarte apropiate, pe acelaşi fragment de restricţie. Aceasta demonstrează că singurul mecanism capabil să aducă informaţia genetică într-o structură coerentă funcţională este reunirea, (prin recombinare genetică) a celor două secvenţe de ADN îndepărtate pentru a forma o secvenţă unică, activă, gena L, în nucleul unui limfocit matur.

Procesul de rearanjare genetică, funcţional în cursul diferenţierii şi dezvoltării celulelor B, este asemănător celui sugerat de Gally şi Edelman, încă din anul 1972, sub denumirea de *recombinare somatică*. Teoria lor presupunea că în celulele somatice diversitatea s-ar produce prin recombinare între un număr limitat de gene V din linia embrionară. Aceste gene ar fi fost selecţionate în cursul evoluţiei pentru capacitatea lor de a genera recombinanţi somatici şi, în mai mică măsură, pentru a determina o anumită specificitate a regiunilor V (Eisen, 1976). Teoria evită necesitatea păstrării îndelungate în evoluţie a unui număr mare de gene, corespunzătoare antigenelor încă neapărute (cum sînt cele sintetice), ca în teoria liniei germinale. Ea evită, de asemenea, ideea improbabilă a apariţiei repertoriului imens de gene V, exclusiv prin mutaţii punctiforme utile, în cursul dezvoltării embrionare (ca în teoria mutaţiilor somatice).

Organizarea genelor imunoglobulinelor

Analiza genetică a demonstrat că polipeptidele din structura Ig sînt codificate de trei grupuri de gene nelinkate, corespunzînd familiei de gene H pentru catenele μ, γ, δ, α, ε şi familiilor k şi λ pentru catenele uşoare respective (L). Fiecare din aceste familii conţine un număr încă controversat de gene V (pentru regiunea variabilă a Ig), situate separat de cîte una sau mai multe gene C (pentru regiunea constantă). La şoarece, genele H sînt localizate pe cromosomul 12, iar cele pentru catenele λ şi k pe cromosomii 16 şi respectiv 6. La om, familia de gene H este localizată pe cromosomul 14, iar k şi λ pe cromosomii 2 şi respectiv 22 (fig. 244).

Organizarea genelor pentru catena L a Ig

Stabilirea structurii şi a ordinii segmentelor care alcătuiesc genele catenei L reprezintă una din primele mari realizări ale tehnologiei ADN recombinant, în domeniul cercetării fundamentale. Clonarea fragmentelor

de ADN de la șoarece într-un fag mutilat genetic, pentru a-i scădea șansele de „supraviețuire" de ~ 100 milioane de ori, a permis, după replicarea în *E. coli*, obținerea unor cantități mari de gene L_K și L_λ, atît din celulele embrionare, cît și din celule mature producătoare de anticorpi și ulterior caracterizarea lor.

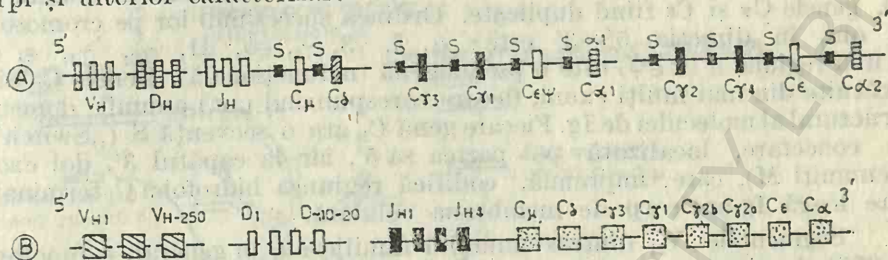


Fig. 244. — Reprezentare schematică a ordinii genelor embrionare pentru regiunea constantă a catenei H la șoarece (A) și la om (B). Regiunile încadrate în dreptunghiuri corespund exonilor. Discontinuitățile liniei care îi leagă marchează distanțe nucleotidice nedeterminate. S — regiune de comutare. Gena εψ este o pseudogenă (nefuncțională) (după Korsmeyer și Waldmann, 1984).

Familia de gene Lk la șoarece. Studiate inițial, aceste gene care codifică lanțul ușor (L) al Ig includ trei regiuni distincte genetic, notate V, J și C. În celulele embrionare există ~ 250 regiuni V_K, 5 regiuni J (dintre care una este nefuncțională) și o singură regiune C.

Fiecare regiune V_K are două segmente funcționale distincte, separate de un intron. Primul segment (L) codifică regiunea „leader" a polipeptidului, lungă de 17—20 de aminoacizi hidrofobi. Ea participă în transportul prin membranele RER și este clivată cînd anticorpul este secretat. Regiunea V_K codifică primii 95 de aminoacizi, din cei 108 ai regiunii variabile a catenei L. Aminoacizii din pozițiile 96—108 sînt codificați de una din cele patru regiuni funcționale de unire J (engl „Joining").

Regiunile J sînt situate în apropierea genei unice C_K, exact în situsul de legare, care permite formarea unei gene active. Ele sînt situate la o distanță de mai multe mii de nucleotide în aval de regiunile V_K. Regiunile J sînt scurte secvențe, repetate de 5 ori, cu variații mici, dar semnificative, la intervale de ~ 300 de nucleotide.

Diferitele regiuni funcționale sînt separate de introni cu dimensiuni variate, care sînt îndepărtați în cursul procesului de „înnădire" a exonilor și de maturare a ARN premesager. Intronii ar avea un rol esențial în determinarea integrității evolutive a genelor structurale sau chiar în modificarea exprimării lor (Korsmeyer și Waldmann, 1984).

Regiunea $V\lambda$ are o structură similară, dar conține numai două segmente L — $V\lambda$ și trei segmente funcționale $J\lambda$. În consecință, rolul său în producerea diversității anticorpilor este mult mai puțin semnificativ.

Organizarea genelor pentru catena H a Ig

Genele pentru catena H a Ig au o alcătuire similară celei a genelor L, cu excepția prezenței unor regiuni suplimentare, numite D („Diversity"), intercalate între regiunile V_H și J_H. Ele amplifică potențialul de diversitate al anticorpilor formați, deosebit de semnificativ, deoarece codifică porțiunea cea mai variabilă a regiunii V_H.

La şoarece există 200—300 regiuni V_H, 10—20 regiuni D, 4 regiuni J şi 8 regiuni C_H. La om există peste 80 de regiuni V_H, 6 pentru J şi 50 pentru D.

Genele C_H, care definesc diferitele clase şi subclase de catene H, sînt distribuite pe o lungime de ~ 200 kb de ADN. Ele sînt în număr de 10, genele $C\gamma$ şi $C\varepsilon$ fiind duplicate. Ordinea succesiunii lor pe cromosom, la om, în direcţia 5′→3′ este: μ, δ, $\gamma3$, γ_1, $\epsilon\psi$, $\alpha1$; γ_2, γ_4, ϵ, α_2. Prima regiune ϵ ($C\epsilon\psi$) este o pseudogenă (nefuncţională). Genele C_H sînt alcătuite din mai mulţi exoni, fiecare corespunzînd unui anumit domeniu structural al moleculei de Ig. Fiecare genă C_H are o secvenţă S („Switch"), de conectare, localizată pe partea sa 5′, iar la capătul 3′, doi exoni (denumiţi M), care, împreună, codifică regiunea hidrofobă C terminală, care leagă Ig-anticorp de membrana celulară.

Segmentele V_H dintr-o anumită familie au, în general, o omologie > 85%, în timp ce gradul de omologie al celor din familii diferite este <75% (Riblet şi colab., 1975).

Regiunile D_H, J_H şi J_L sînt adevărate minigene, deosebit de importante, deoarece codifică porţiunile majore ale regiunii hipervariabile RDC3 (a treia regiune determinantă de complementaritate) a catenelor H şi L. Nu au fost identificate subsegmente genice corespunzătoare celorlalte două regiuni hipervariabile, RDC1 şi RDC2.

Mecanismele asamblării genelor active pentru Ig-anticorp

Primele cercetări asupra formării şi exprimării genelor Ig active au fost efectuate asupra genelor care codifică IgM la şoarece, respectiv catena L_k şi ulterior H_μ. Studiul diferenţierii celulelor-stem la limfocite B sugera necesitatea a două procese de rearanjare genetică, fapt confirmat şi prin cercetările de genetică.

Primul proces, asociat cu diferenţierea de la stadiul de celulă-stem la cel de celulă pre-B, implică asamblarea genei care codifică o catenă grea H funcţională. Ea are ca rezultat apariţia catenelor μ în citoplasma celulară („μ cit").

Cea de-a doua rearanjare genetică este corelată cu etapa de diferenţiere a celulelor pre-B în celule $B\mu$, şi determină asamblarea catenelor uşoare L_k sau $L\lambda$. Ca urmare, moleculele de IgM funcţionale, cu rol de receptor de antigen (IgMm), pot să apară pe suprafaţa celulelor B, iar după activarea acestora de către antigene pot fi secretate în mediu (fig. 245).

Formarea genei active pentru catena L

În cursul diferenţierii celulelor-stem pluripotente, pentru a forma limfocite B şi plasmocite producătoare de anticorpi, are loc un proces de rearanjare a diferitelor segmente ale ADN prin recombinare, urmată de îndepărtarea intronilor din ARN premesager, prin procese de clivare şi înnădire („Splicing")*. Fig. 246 prezintă evoluţia acestui proces pentru catena uşoară L_k la om.

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 476.

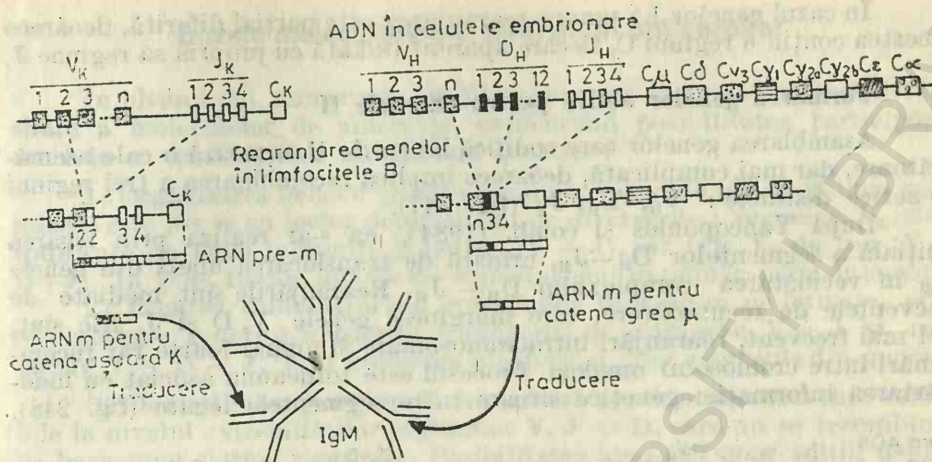


Fig. 245. — Reprezentare schematică a rearanjărilor genetice produse în limfocitele B în cursul sintezei de IgM (după Rougeon, 1985).

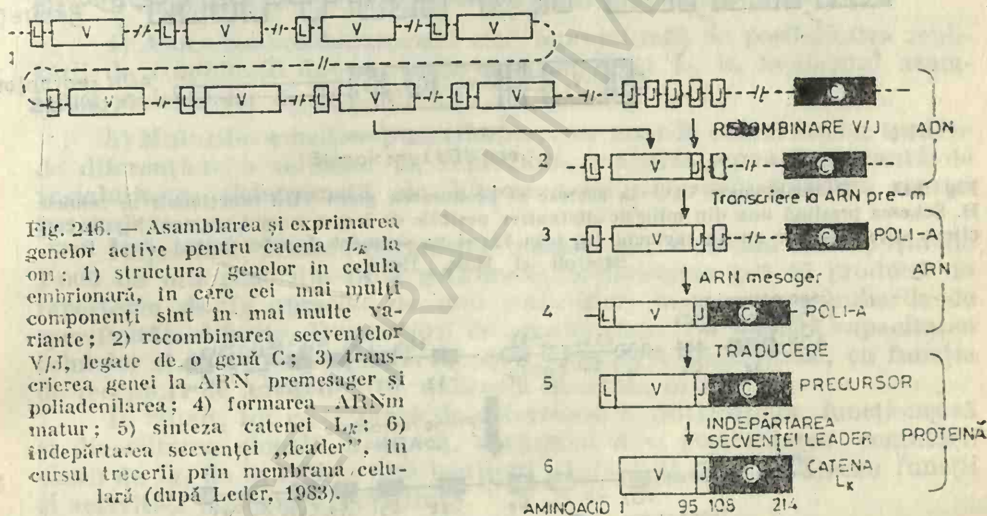


Fig. 246. — Asamblarea și exprimarea genelor active pentru catena L_k la om: 1) structura genelor în celula embrionară, în care cei mai mulți componenți sînt în mai multe variante; 2) recombinarea secvențelor V/J, legate de o genă C; 3) transcrierea genei la ARN premesager și poliadenilarea; 4) formarea ARNm matur; 5) sinteza catenei L_k; 6) îndepărtarea secvenței „leader", în cursul trecerii prin membrana celulară (după Leder, 1983).

În celulele embrionilor, componenții genei active se găsesc în configurația caracteristică celulelor germinale. Regiunile V și J sînt în mai multe variante (~ 250 și respectiv 5) (1). Într-o primă etapă, una din numeroasele regiuni V se unește cu una din regiunile de legare J (selecția lor este total aleatorie), pentru a forma, împreună cu regiunea C, gena activă pentru catena L_k. Legarea lor este efectuată de enzimele care îndepărtează secvențele de ADN intermediare (2). După transcriere integrală la ARN premesager și poliadenilare (3) are loc îndepărtarea intronilor și legarea în continuitate a exonilor. ARNm matur astfel format (4) este tradus la o moleculă-precursor (5), din care, pentru a forma catena Lk matură (6), secvența „leader" (L) este îndepărtată prin clivare, în cursul transferului prin membrana celulară.

În cazul genelor Lλ umane rearanjarea este parțial diferită, deoarece acestea conțin 6 regiuni C, fiecare aparent linkată cu propria sa regiune J.

Formarea genelor active pentru catenele H

Asamblarea genelor care codifică lanțurile H urmează o cale asemănătoare, dar mai complicată, deoarece implică recombinarea a trei regiuni genetice distincte: V_H, D_H, J_H (fig. 247).

După Yancopoulos și colab. (1984), ea s-ar realiza prin legarea inițială a segmentelor D_H—J_H, urmată de translocarea uneia din genele V_H în vecinătatea complexului D_H— J_H. Rearanjările sînt mediate de secvențele de recunoaștere, care mărginesc genele V, D și J. Ele sînt, cel mai frecvent, rearanjări intracromosomale și numai foarte rar recombinări între cromosomi omologi. Procesul este totdeauna asociat cu îndepărtarea informației genetice situate între segmentele legate (fig. 248).

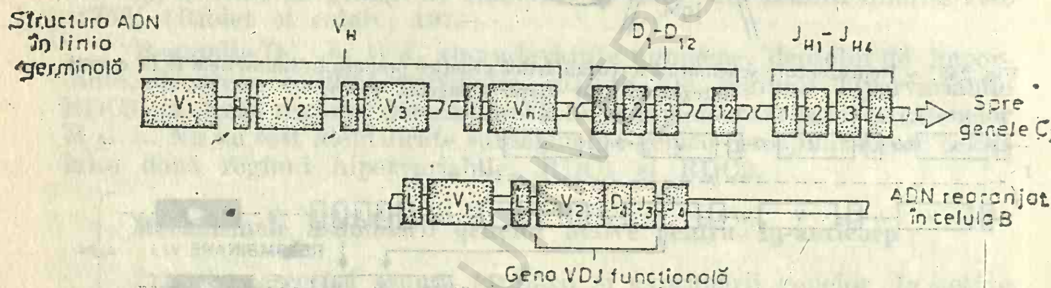


Fig. 247. — Recombinarea VDJ la șoarece și producerea genei VDJ funcționale în celulele B. Schema prezintă una din miile de alternative posibile de legare a unui segment V_H din cele cîteva sute existente cu un segment D_H (din 12) și un segment J_H (din patru) (după Roitt, Brostoff și Male, 1985).

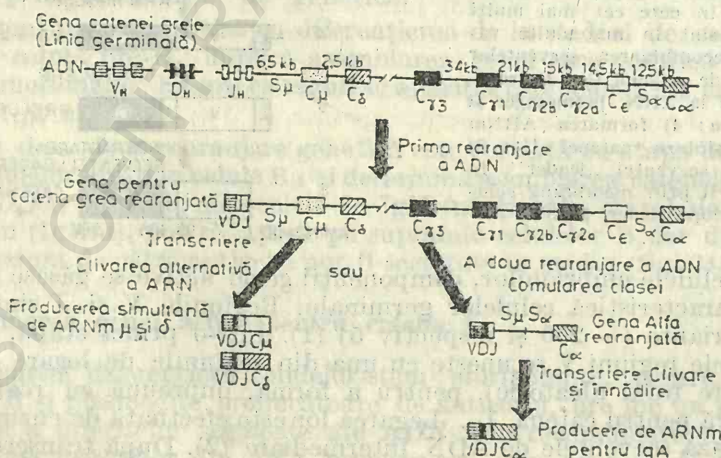


Fig. 248. — Formarea genelor active pentru catena H la șoarece. După prima rearanjare a ADN, prin recombinarea regiunilor $V_HD_HJ_H$, celula B, utilizînd situsuri alternative de clivare a ARNm, poate produce simultan IgM și IgD. Aceeași celulă poate comuta clasa de Ig prin recombinare la situsuri *S*, cu înalt grad de omologie. Figura prezintă comutarea la IgA (după Korsmeyer și Waldmann, 1984).

Bazele moleculare ale diversității anticorpilor

În ultimii ani, numeroase studii au încercat să explice imensa diversitate a moleculelor de anticorpi, evidențiind posibilitatea participării asociate a următoarelor mecanisme genetice :

1) Organizarea genelor pentru regiunile variabile ale Ig în linia germinală este *per se* un factor determinant de diversitate : regiunile V_L sînt codificate de două segmente genetice $(V + J)$, iar cele V_H de trei $(V + D + J)$. În plus, fiecare din aceste segmente sînt în număr mare în genom.

2) Legarea combinatorială corespunde procesului de formare, prin recombinare genetică, a diferite combinații de complexe $V - J$ și respectiv $V - D - J$, prin asocierea aleatorie a unor segmente din genom.

3) Flexibilitatea joncțională are la bază apariția unor secvențe variabile la nivelul extremităților regiunilor V, J și D, care nu se recombină, pe baza unor norme riguroase. Posibilitatea apariției unor adiții, deleții sau substituiri de baze la nivelul lor, în momentul formării complexelor $V - J$, $V - D$ și $D - J$, are drept urmare un grad important de imprecizie în structura secvențelor genetice la nivelul joncțiunilor lor.

4) Asocierea combinatorială este reprezentată de posibilitatea realizării de combinații diferite între catenele H și L, în momentul asamblării moleculelor de Ig.

5) Mutațiile somatice punctiforme, care apar în cursul fazelor tardive de diferențiere a celulelor B, reprezintă o ultimă sursă importantă de variabilitate, determinată de hipermutabilitatea caracteristică acestei perioade.

Împreună, aceste mecanisme permit ca, utilizînd mai puțin de 1 000 de minigene din linia germinală, organismele pot să producă un repertoriu de Ig apreciat de unii cercetători la > citeva miliarde de specificități diferite. Diversității de specificitate i se adaugă capacitatea celulelor B de a produce molecule de Ig legate de membrane, cu funcția de receptori de antigen și de molecule secretate în mediu.

În sfîrșit, tot ca o formă de diversitate a anticorpilor funcționează și diversitatea clonală izotipică, decurgînd din posibilitatea comutării clasei de Ig, de la IgM la alte izotipuri (IgD, IgG, IgA, IgE), cu funcții și activități biologice specializate.

Mecanismele moleculare de recombinare a genelor Ig

Studiul formării regiunilor variabile ale lanțurilor L și H demonstrează rearanjarea segmentelor genetice corespunzătoare prin recombinare genetică. În cursul acestui proces, numit de legare combinatorială („Combinatorial joining"), oricare dintre regiunile V și J se pot uni pentru a forma regiunea V a lanțului L. În mod similar, prin procese de recombinare aleatorie, oricare din segmentele V_H, D_H și J_H existente în structura genetică se pot combina pentru formarea regiunii V_H.

Deși recombinarea diferitelor segmente este aleatorie, ea ascultă, după unii autori, de anumite reguli și mecanisme încă necunoscute. Este probabil că un rol important revine recombinazelor prezente în

precursorii celulelor B (Rougeon, 1986). Analiza genetică a regiunilor V_K şi J_K din celulele embrionare, comparativ cu cele din celulele mature, a scos în evidenţă faptul că acest proces are caracterul de recombinare la situs specific. Ipoteza se bazează pe două argumente: 1) unirea celor două regiuni are loc, totdeauna, la nivelul codonului 96, care codifică aminoacidul cu acelaşi număr din catena L; 2) prezenţa unui set specific de baze, întîlnite în mod constant la toate sistemele de gene pentru Ig studiate, ceea ce sugerează posibilitatea intervenţiei lor ca secvenţe de recunoaştere între cele două regiuni, înainte de recombinare (Leder şi Hood, 1980).

Structura şi rolul secvenţelor de recunoaştere. Analiza genetică a regiunilor care codifică Ig în celulele limfoide embrionare a confirmat prezenţa unor secvenţe, care prin structura lor caracteristică şi constantă, ca şi prin localizările asemănătoare în toate categoriile de gene studiate sugerează posibilitatea participării lor în procesele de recombinare. Ele sînt cunoscute sub denumirea de secvenţe de recunoaştere („Recognition sequences") sau semnale de recombinare („Recombination signals").

Conservarea lor ca atare în toate familiile de gene studiate, deşi separarea lor în cursul evoluţiei s-a produs acum > 500 de milioane de ani, pledează, de asemenea, pentru o funcţie cu importanţă fundamentală pentru celule (Blackwell şi Alt, 1984).

Astfel, în primul rînd s-a demonstrat că fiecare segment V sau D are „în aval" (înspre gena J) două secvenţe semnal: prima, formată din 7 nucleotide, alcătuieşte heptamerul CACAGTG sau analogul său complementar (GTGTCACC). Ea este urmată de o secvenţă variabilă numită spaţiator („Spacer") sau distanţier şi apoi de o a doua secvenţă-semnal, reprezentată de nonamerul ACAAAAACC sau analogul său complementar (TGTTTTTGG). În al doilea rînd s-a demonstrat că toate segmentele D şi J din structura genetică germinală sînt precedate, în mod asemănător, de două secvenţe semnal. De data aceasta, prima este un nonamer, iar cea de-a doua, un heptamer, separate, de asemenea, de o secvenţă-spaţiator variabilă.

Sînt de reţinut două particularităţi esenţiale:

1) Secvenţele-spaţiator intercalate V, J şi D sînt lungi de 12 baze, în timp ce toţi spaţiatorii regiunilor V_λ, V_H şi J_H, au în medie, 23 de baze (22—24 baze).

2) Secvenţele heptamere şi nonamere, care urmează unui segment V_L, V_H sau D sînt complementare celor care preced segmentele J_L D sau J_H.

Acest tip de structură a dus la ideea participării lor în recombinare în urma împerecherii bazelor, după regula A — T, C — G şi formarea unei structuri de tip „trunchi şi buclă" („stem and loop") (fig. 249). Aceasta aduce cele două segmente cu rol de codificare, V_K şi J_K, adiacent una faţă de alta, creînd condiţii favorabile de recombinare.

Modelele ipotetice propuse consideră structurile de acest tip intermediare în procesul de recombinare, dar unele detalii rămîn obscure. Deşi este evident că structurile „semnal de recombinare" pot media rearanjări ale ADN, furnizînd omologia necesară pentru recunoaşterea şi alinie-

rea a două segmente genetice, împerecherea directă a ADN este improbabilă, datorită zonelor mici de complementaritate (de 7 și respectiv 9 nucleotide) și separării lor de spațiatori cu lungimi diferite. Pentru a suplini aceste lacune ale modelelor propuse au fost formulate o serie de ipoteze alternative, bazate pe cunoștințele actuale, pînă la descifrarea lor certă.

După o primă ipoteză, secvențele de recunoaștere ar servi ca situsuri de legare pentru proteinele care mediază procesul de recombinare sau pentru proteine specifice de legare. Studiile genetice pledează pentru ideea că două regiuni genetice pot fi reunite numai dacă sînt mărginite de semnale de recunoaștere de tip opus, respectiv cînd unul are un spațiator scurt, iar celălalt un spațiator lung. Nu se știe exact cum se realizează acest proces și cum sînt juxtapuse două segmente separate spațial de distanțe mari pe cromosom. Faptul că un spațiator scurt (de 12 nucleotide) interacționează totdeauna numai cu unul lung de 23 de nucleotide pledează pentru ideea că proteinele de recunoaștere trebuie „să vadă" porțiunile conservate ale „semnalului" în orientări identice în molecula de ADN.

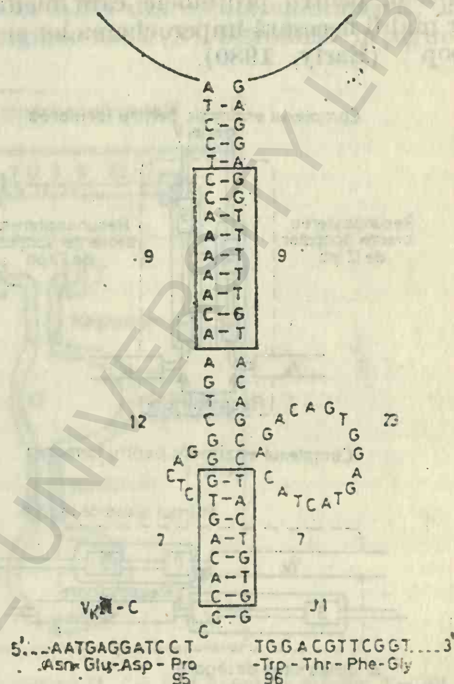


Fig. 249. — Model ipotetic de structură intermediară „trunchi și buclă" în recombinarea V — J. Secvențele heptamere și nonamere complementare (încadrate) alcătuiesc o structură care permite secvențelor V și J să formeze perechi de baze (după Tonegawa, 1981).

Modelul cel mai simplu postulează că în recombinarea $V_K - J_K$, segmentul de ADN situat între cele două regiuni este pierdut prin deleție, în cursul rearanjării segmentelor de ADN (Korsmeyer și Waldmann, 1984). Procesul de clivare și deleție ar fi mediat de un sistem enzimatic, încă nedescoperit (Leder, 1982).

După o altă ipoteză, recombinaza ar conține două subunități, care s-ar lega de moleculele de ADN. Una dintre ele ar recunoaște heptamerul și nonamerul, separate de un spațiator scurt (12 baze), iar alta, pe cele separate de un spațiator lung de 23 de baze.

După o ipoteză alternativă, împerecherea bazelor s-ar face direct între heptamere și nonamere, iar enzimele de recombinare ar recunoaște ansamblul structurii formate în acest fel (fig. 250).

În sfîrșit, după Max (1984), în cazul formării genelor pentru catena L_K, structurile „trunchi și buclă" ar aduce segmentele V_K și J_K în apropiere strînsă, permițînd legarea lor de o enzimă capabilă să secționeze și să lege ADN („DNA nicking-closing enzyme"). Un al doilea mecanism

potențial ar putea asigura transcrierea la o nouă moleculă de ADN, cu structură continuă, printr-un mecanism de copiere alternativă („copy-choice"), care asamblează o catenă nouă, complementară regiunilor V și J, dar „ignoră" ADN din „trunchi și buclă". Un rol alternativ al heptamerelor și nonamerelor ar fi de a servi ca secvențe de recunoaștere *directă*, pentru proteinele care mediază recombinarea. În acest caz nu ar mai fi necesară împerecherea lor și nici formarea de structuri „stem and loop" (Early, 1980).

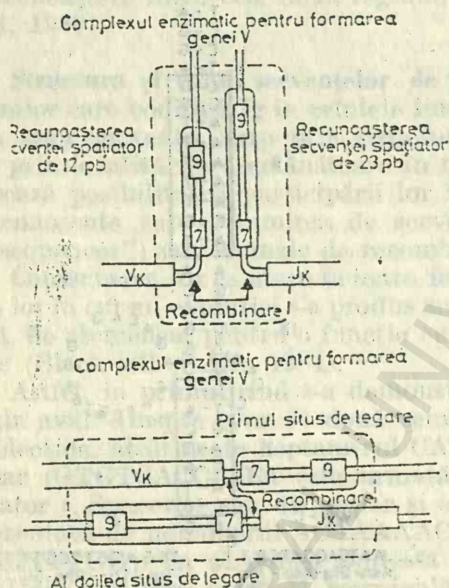


Fig. 250. — Reprezentare schematică a două aranjamente potențiale ale segmentelor de recunoaștere în vederea recombinării, mediată de enzime a segmentelor de gene (după Hood și colab., 1984).

Procesul de legare combinatorială are loc și pentru segmentele genei H, după o schemă generală similară, dar mai complexă (datorită prezenței segmentului D), și, ca atare, cu o contribuție mai mare la producerea diversității totale a anticorpilor unui individ. În cazul genelor pentru lanțul H, secvențele-semnal pentru regiunea V_H sînt localizate pe partea lor distală (3′), iar cele care aparțin segmentului J_H la extremitatea proximală 5′ a acestuia. Mărimea spațiatorilor dintre semnalele de recombinare (heptamere și nonamere) ar fi egală (22 de nucleotide), după Korsmeyer și Waldmann (1984), și puțin diferită (21 și respectiv 20 nucleotide), după Leder (1984). Segmentele D_H, prezente în genom sub forma unui set de familii, sînt toate flancate de ambele părți (5′ și 3′) de secvențe-semnal (heptamere și nonamere) separate de 11 pb (fig. 251).

Flexibilitatea de legare. Procesul de legare combinatorială este capabil să amplifice diversitatea anticorpilor, datorită variabilității diferitelor puncte de legare. Variațiile joncționale sînt legate de o anumită imprecizie a situsurilor de recombinare, care modifică secvența ADN la nivelul joncțiunilor $V_L - J_L$, $V_H - D_H$ și $D_H - J_H$. Limitate ca amploare în cazul catenelor L, reprezintă o sursă importantă de diversitate în cazul

catenelor H. Variațiile joncționale pot fi determinate de adiții, deleții sau substituiri de nucleotide (fig. 252).

Astfel, Heidmann și Rougeon (1983) au semnalat posibilitatea pierderii unui sau mai multor codoni în regiunea J_L, care modifică secvența situsului de combinare. Alt și Baltimore (1982) au semnalat posibilitatea adăugării unor nucleotide inexistente în ADN din celula embrionară, la joncțiunea D_H — J_H. Ele formează o regiune nouă (N), introdusă în struc-

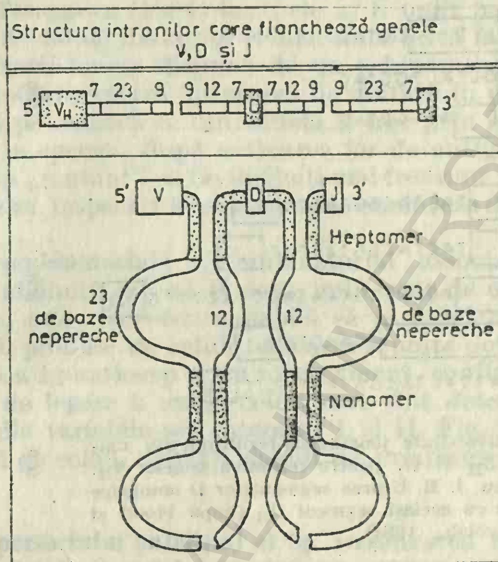


Fig. 251. — Recombinarea genelor V, D și J ale catenei H. Cei trei exoni ai genelor V_H au o secvență heptamer — 23 de baze neîmperecheate — nonamer care corespunde unei secvențe pe latura 5′ a genelor D. Secvențe similare corespunzătoare se găsesc pe partea 3′ a genei D și 5′ a genei J. Recombinarea implică îndepărtarea intronilor și hibridarea între secvențele heptamer și nonamer. Secvențele de 12 și 23 baze neîmperecheate pot acționa ca semnal pentru enzimele de recombinare. Regula 12/23 asigură recombinarea numai cînd „buclele" au acest număr de baze neîmperecheate și face imposibilă legarea directă a genei V_H de J_H, care ar produce două bucle de 23 de baze neîmperecheate (după Male, Champion și Cooke, 1987).

tura ADN de o ADN polimerază — terminal dezoxinucleotidil transferaza (TdT) — prezentă în celulele B imature. Ea poate adăuga la întîmplare nucleotide la extremitățile 3′ ale unei catene de ADN, înainte de a lega situsurile de joncțiune (Desiderio și colab., 1984). În sfîrșit, substituirile de nucleotide în regiunea de crossing-over dintre regiunile V și J ale catenei L_K pot modifica semnificativ secvența genei active, generînd, de asemenea, diversitate în structura Ig. În funcție de natura lor, au fost semnalate modificări ale codonului 96, care pot varia de la TGG (triptofan) la CGG (arginina) sau CCG (prolină) (fig. 253).

Kaartinen și Makela (1985) au semnalat o sursă adițională de diversitate, datorită posibilității de citire a informației genetice din regiunea D, în trei cadre de citire diferite. Aceasta determină modificări semnificative în secvența aminoacizilor. După cum decodificarea demarează după

primul, al doilea sau al treilea nucleotid, cadrul flexibil de legare poate modifica semnificativ şi structura catenei H, atunci cînd au loc reunirile între V_H, D_H şi J_H.

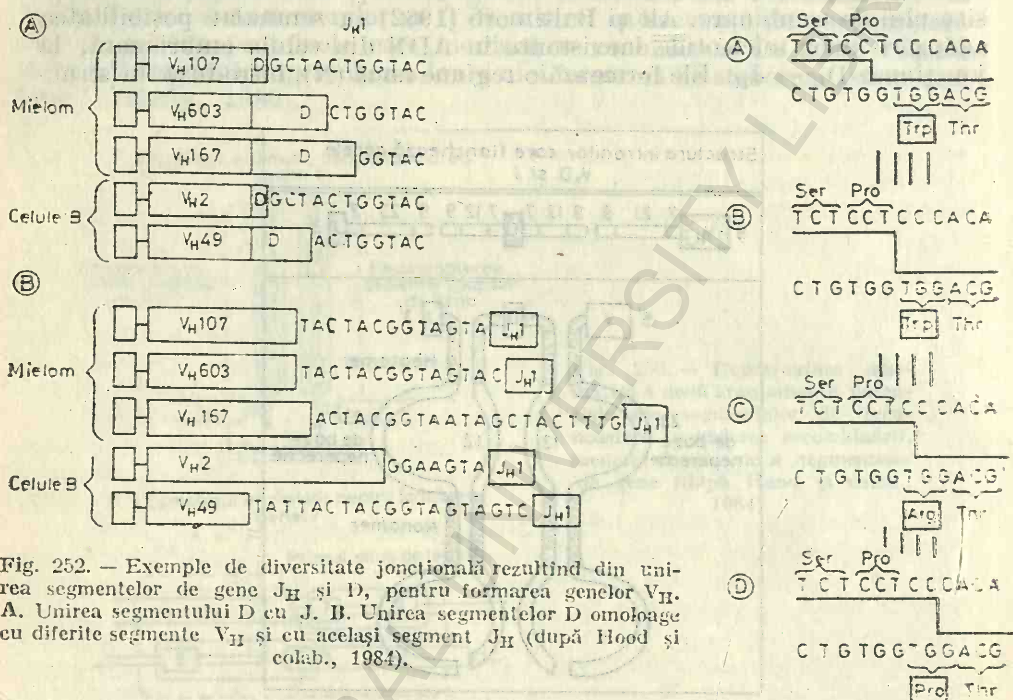


Fig. 252. — Exemple de diversitate joncţională rezultînd din unirea segmentelor de gene J_H şi D, pentru formarea genelor V_H. A. Unirea segmentului D cu J. B. Unirea segmentelor D omoloage cu diferite segmente V_H şi cu acelaşi segment J_H (după Hood şi colab., 1984).

Fig. 253. — Cadrul flexibil de recombinare V — J explică variabilitatea la nivelul codonului 96. A. Structura „normală'' a situsului de combinare. B. Legarea între codonii 95 şi 96 modifică numai cea de-a treia bază („tăcută'') din codonul 95. C. Recombinarea în codonul 96 modifică TGG (Trp) la CGG (Arg). D. Codonul 96 devine CCG (Pro).

În schimb, datorită diversităţii sale limitate în celulele embrionare, familia genelor L nu contribuie, în mod semnificativ, la diversificarea anticorpilor la şoarece.

Mutaţiile somatice ca factor al diversităţii anticorpilor. Studiul secvenţei aminoacizilor în unele molecule de Ig-anticorp a evidenţiat, uneori, o lipsă de corespondenţă în raport cu secvenţa codonilor în moleculele de ADN din celulele embrionare. De asemenea, compararea secvenţei nucleotidice a genelor V_H din unele plasmocitoame cu echivalentele lor din linia germinală a arătat prezenţa mai multor modificări de cîte o singură bază în cele dintîi. Modificările sînt concentrate în mijlocul genei, dar şi dispersate în ambele regiuni care o flanchează, 3′ şi 5′. Această localizare, precum şi absenţa unor modificări similare în genele liniei germinale şi în cele ale regiunii constante C_H arată natura mutaţională a acestui proces (Kim şi colab., 1981). Studiul a 19 proteine de

mielom, provenite de la șoareci identici genetic („inbred"), a arătat că 12 aveau o secvență a aminoacizilor corespunzătoare informației genetice embrionare, iar 7 prezentau diferențe în natura a 1—3 aminoacizi. Mutațiile apar atît în regiunile V, corespunzătoare situsului de legare a antigenului, cît și în zonele adiacente, denumite regiuni „cadru" („Framework"). Mecanismul molecular care face din regiunile variabile o țintă privilegiată pentru mutații este necunoscut.

Melvin Cohn (1982) consideră că mutațiile apar odată la 10 000 celule/generație. După Tonegawa (1984) însă, ele ar fi mult mai frecvente și ar apărea la fiecare 3—30 de diviziuni celulare, datorită faptului că limfocitele B și progenitorii lor ar dispune de un echipament enzimatic (încă neidentificat), care favorizează inducerea de mutații în regiunea V. Mutațiile s-ar acumula pe măsură ce limfocitele B trec prin stadiile progresive de dezvoltare și, în special, după activarea lor de antigene. Aceasta face ca anticorpii de tip „mutant" să fie întîlniți mai frecvent în stadiile tardive ale răspunsului imun, respectiv în cele asociate cu sinteza de IgG și de IgA.

Asocierea combinatorială („Combinatorial association") este procesul prin care o anumită catenă H dată, indiferent de clasa sau subclasa căreia îi aparține, este, teoretic, capabilă să se asocieze cu oricare din catene L_κ sau $L\lambda$ produse de celulă. Această reunire determină formarea structurii de bază a Ig-anticorp și, în mod evident, configurația și specificitatea situsului de legare a antigenelor, care sînt determinate în egală măsură de regiunile variabile ale catenelor L și H. Fig. 254 prezintă sintetic, după Hood și colab. (1984), modul de producere al unora dintre aceste procese.

Mărimea repertoriului potențial al Ig. Descifrarea structurii segmentare a genelor pentru Ig în celulele embrionare și a mecanismelor ce determină rearanjarea lor pentru a forma gene active a lămurit una dintre enigmele mari ale imunologiei, respectiv modul în care un singur animal poate să producă mai multe milioane de anticorpi cu specificități diferite. În primul rînd trebuie făcută o distincție netă între : 1) *repertoriul disponibil* („Available repertoire"), reprezentat de numărul de paratopi diferiți, prezenți în sistemul imunitar al unui mamifer, la un moment dat (care este de ordinul mai multor milioane), și 2) *repertoriul potențial* (numărul total al paratopilor (situsurilor de combinare) diferiți, ce pot fi teoretic produși), caree ste mult mai mare. Mai mulți autori au încercat să cuantifice aportul diferitelor etape și amploarea finală a acestei diversități enorme.

Milstein, Even și Berek (1986) consideră că acest repertoriu depășește un miliard de specificități diferite. Pe baza datelor considerate ca subestimative ale lui Kaartinen și colab. (1983), asortarea aleatorie a ~ 200 gene V (pentru fiecare catenă L sau H), cu 4 gene J și respectiv 20 gene D (în cazul H), dă valorile de 800 catene L_κ și 16 000 catene H. Numărul de variații care pot fi produse prin flexibilitatea joncțională în cazul legării V_κ — D_κ este apreciat la 2,5, iar în cazul catenelor H, tot cîte 2,5 pentru fiecare pereche V_H — D_H și D_H — J_H. Diferențele de mărime determinate de utilizarea genelor D_H și J_H sînt apreciate (tot subestimînd) cu factorul 5.

Se ajunge la valorile : 1) $800 \times 2,5 = 2\,000$ catene L ; 2) $16\,000 \times 2,5 \times 2,5 = 100\,000 \times 5 = 500\,000$ catene H ; 3) combinarea lor potențială este $2\,000 \times 500\,000 = 1 \times 10^9$. La acestea se adaugă diversitatea introdusă de alte procese probabile (ca mutația somatică) și cele care apar în cursul legării (de exemplu, apariția regiunii „N" descrisă de Alt și Baltimore (1928)).

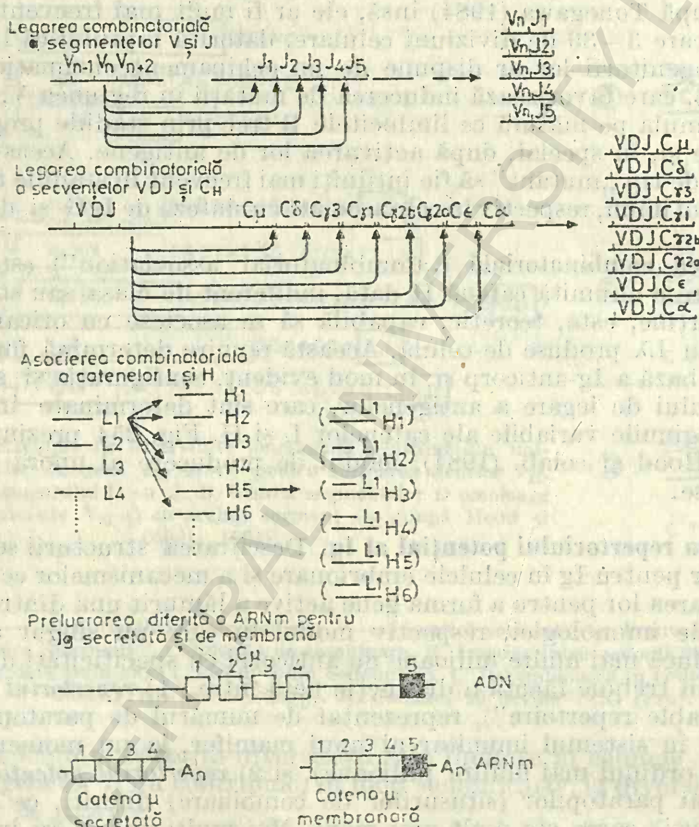


Fig. 254. — Strategii combinatoriale posibile la nivelul ADN, ARN și al proteinelor în cadrul familiilor de gene pentru imunoglobuline (după Hood și colab., 1984).

Semnificația surselor de variație. Organismul mamiferelor dispune de mecanisme subtile, care acționînd în timp, sub control riguros, asigură diversificarea regiunilor V, în cursul dezvoltării celulelor B :

1) *Recombinarea genetică* este inițiată foarte timpuriu și este probabil completă în momentul în care celulele sînt expuse contactului cu antigenele. Joncțiunile $V_L - J_L$ și $V_H - D_H - J_H$ corespund celei de-a treia regiuni hipervariabile a catenelor L și H, respectiv unor porțiuni esențiale ale situsurilor de recunoaștere și de legare a antigenelor.

2) *Variațiile joncționale* conferă o extraordinară versatilitate regiunii respective, greu de conceput dacă recombinarea ar fi exactă. Rezultatul acestor procese este reprezentat de crearea unei populații de celule B foarte heterogene sub raportul specificității, din care antigenele selecționează clona corespunzătoare determinanților lor.

3) *Mutațiile somatice* intră în acțiune în cursul proliferării și diferențierii clonelor de celule B selecționate. După Tonegawa (1985), ele pot amplifica diversitatea situsurilor de legare de cel puțin 100 de ori. În același timp, hipermutația somatică, în prezența antigenului, ar permite proliferarea clonală, în special a celulelor care produc Ig cu mare afinitate pentru antigene. În felul acesta, ele asigură și o modulare fină a răspunsului imun.

Leder (1982) apreciază că flexibilitatea cadrului de recombinare mărește de 10 ori diversitatea genelor V_K și de 100 de ori pe cea a genelor V_H. După aprecierile sale, numărul teoretic posibil al anticorpilor diferiți ar fi de ~ 18 miliarde. După Rougeon (1986), numărul anticorpilor diferiți la un animal mic (șoarecele) ar putea corespunde numărului de celule B din organism.

Rearanjări productive și neproductive. Constituirea unui repertoriu de Ig atît de diversificat este, în mod necesar, asociată cu posibilitatea unor eșecuri în cursul rearanjărilor genetice posibile. Practica a demonstrat că flexibilitatea de legare are drept rezultat apariția unor recombinări aberante, mai frecvente în cazul catenelor H (care necesită joncțiuni la două nivele V — D și D — J), decît în cazul catenelor L, care au numai una (V — D).

Rearanjările neproductive sînt consecința legării segmentelor adiacente într-un cadru de citire incorect, care determină apariția unui codon-stop, în aval de punctul de „înnădire", cu imposibilitatea producerii unui polipeptid funcțional.

Prin contrast, *rearanjările productive* corespund situațiilor în care segmentele de gene sînt legate corect în cadrul de citire („în fază"), în așa fel încît se pot sintetiza polipeptidele active.

Frecvența rearanjărilor neproductive este apreciată la ~ 15% pentru catenele k și de ~ 45% pentru catenele H. Aceste frecvențe foarte mari în raport cu precizia cu care evoluează procesele biologice în general, ar putea reprezenta „prețul" plătit de organism pentru menținerea sistemului flexibil de recombinare. Ele ar putea sta la baza unui mecanism care ar stimula utilizarea unor segmente de gene alternative, favorizînd prin aceasta amplificarea diversității anticorpilor. În plus, ar putea fi una din explicațiile vitezei mari de reînnoire a celulelor B în organism.

Excluderea alelică

Înțelegerea mecanismului de formare a genelor pentru Ig și descoperirea recombinărilor aberante care produc gene inactive au permis explicarea fenomenului de excludere alelică („Allelic exclusion").

Fiecare celulă somatică are două seturi de cromosomi (unul din fiecare pereche fiind de proveniență maternă, iar celălalt de orgine paternă). Într-o

celulă producătoare de anticorpi, numai genele Ig de pe unul din cromosomii corespunzători suferă procesul de rearanjare, evoluînd spre forma de genă activă, care este final tradusă la un polipeptid funcțional. Alelele de pe celălalt cromosom sînt excluse din procesul de rearanjare și, ca atare, nu sînt exprimate.

Ocazional însă, o celulă producătoare de anticorpi poate avea două seturi de gene rearanjate. Astfel, Korsmeyer și Leder (1981) au găsit limfocite B umane, care, deși produceau catene Lλ, aveau rearanjate cele două regiuni V_K (de pe ambii cromosomi). În schimb, limfocitele B care produceau catene V nu aveau rearanjate regiunile Vλ. Ei au formulat două concluzii : 1) regiunile V_K sînt rearanjate genetic probabil înaintea regiunilor Vλ ; 2) rearanjarea Vλ s-a produs datorită faptului că cele două rearanjări V_K posibile, anterioare, au produs gene V_K nefuncționale. Ipoteza a fost confirmată de studiile consacrate formării catenei H, care au demonstrat că prima rearanjare genetică, în timp, are loc în limfocitele B cele mai imature. Ea constă în legarea regiunilor D_H — J_H pe ambii cromosomi parentali. Dacă una din rearanjări este de așa natură încît regiunea J_H este funcțională (poate fi decodificată corect), complexul D_H — J_H se recombină imediat cu o regiune V_H. Dacă prin această legare se păstrează cadrul corect de citire pentru a produce o genă și respectiv o catenă H funcțională, rearanjările pe cel de-al doilea cromosom sînt blocate. Dacă rearanjările inițiale nu sînt funcționale (recombinarea s-a făcut aberant) se declanșează o a doua „încercare", prin rearanjarea genelor de pe celălalt cromosom.

Excluderea alelică funcționează deci ca un mecanism de siguranță, creînd o posibilitate de rezervă, în cazul în care recombinările genetice inițiale eșuează (Alt și colab., 1984).

Diversitatea clonală izotipică. Comutarea clasei imunoglobulinelor

Procesul prin care o singură celulă B, sau descendenții săi, poate trece de la sinteza unei anumite clase de Ig la alta, prin legarea aceleiași regiuni variabile cu diferite regiuni constante de lanțuri grele (C_H), este numit *comutarea clasei lanțului greu* („Heavy-chain class switching"). El are drept consecință diversitatea clonală izotipică, respectiv apariția a diferite clase de Ig-anticorp cu aceeași specificitate, dar cu activități biologice diferite. Prin acest mecanism deci o clonă dată de celule B sintetizează aceleași regiuni variabile, cu aceeași specificitate de legare a antigenelor, pe care le poate lega însă simultan sau succesiv de regiuni C_H, ce aparțin unor clase diferite, printr-un proces de *reasortare a regiunilor constante* („Constant-region shuffling").

Deoarece lanțurile H conferă Ig funcții efectoare diferite, în funcție de clasa căreia îi aparțin, fenomenul permite aceleiași regiuni variabile să participe în diferite reacții imunitare. Fenomenul poate fi observat în cursul diferențierii celulelor pre-B (Bμ) la celule B mature (Bμ + δ) și în cursul răspunsului imun, prin tranziția la sinteza de IgG, IgA sau IgE. Menținerea sintezei unei singure regiuni V și legarea ei succesivă de regiuni C diferite pune probleme importante privind organizarea, exprimarea și

reglarea genelor pentru anticorpi. Comutarea clasei Ig se poate realiza pe două căi : 1) printr-o modalitate particulară de recombinare a ADN și 2) prin transcriere, clivare și „înnădire" diferențială a ARN.

Cartarea locusului genetic H la șoarece. Un rol important în descifrarea mecanismelor comutării l-a avut stabilirea structurii și ordinii genelor respective, realizată de Hood și Tonegawa (1979), pentru genele μ, γ și α (1979), și de Blattner (1980), pentru gena δ. S-a stabilit astfel că gena $C\mu$ este situată la capătul 5', urmată imediat aproape de gena $C\delta$ și, după un interval mare (în direcția 5' → 3' sau din amonte spre aval), de grupul genelor $C\gamma$, în ordinea $C\gamma3$, $C\gamma1$, $C\gamma2b$, $C\gamma2a$. Urmează apoi gena $C\varepsilon$ și la extremitatea 3' gena $C\alpha$. Deoarece genele J_H sînt localizate pe partea 5' a genei $C\mu$ și întrucît în amonte nu se găsește nici o altă genă C_H, primul izotip exprimat totdeauna este IgM. Apropierea strînsă dintre genele $C\mu$ și $C\delta$ la șoarece (~2500 pb) ar putea explica posibilitatea producerii simultane a IgM și IgD, cu aceeași regiune V, deci cu aceeași specificitate pe suprafața celulelor mature $B\mu + \delta$, competente pentru a lega antigenele, pentru a iniția răspunsul imun și a se diferenția la celule producătoare de anticorpi.

Comutarea clasei Ig prin recombinare. Prezența acestui mecanism a fost demonstrată prin clonarea genei $C\mu$ embrionare și compararea ei cu cea a genei funcționale MOPC 141, care codifică $C\gamma2b$. S-a constatat prezența bazelor corespunzătoare unui segment J înaintea genei $C\gamma$ 2b funcționale și absența acestora înainte de gene $C\gamma$ 2b embrionară. În schimb, înaintea genei $C\mu$ embrionare au fost evidențiate mai multe segmente J, între care și unul identic cu cel întîlnit înaintea genei $C\gamma$ funcționale.

Analiza genetică a locusului C_H a demonstrat că genele respective, cu excepția posibilă a genei $C\delta$, sînt precedate de secvențe caracteristice, numite *semnale de comutare* sau *regiuni S* („switch"), cu rol de situs activ în schimbarea clasei lanțurilor H. Afirmația este bazată pe faptul că toate evenimentele de comutare studiate pînă în prezent sînt localizate în structura unei regiuni de acest tip. Semnalele de comutare, în general secvențe relativ lungi de ADN (2 000 –3 000 pb în cazul regiunii $S\mu$), sînt formate din unități scurte, repetitive, aranjate în tandem care, la rîndul lor, conțin scurte repetiții de baze, foarte asemănătoare în toate semnalele analizate. Regiunea $S\alpha$, spre exemplu, are 1 600 de nucleotide și este formată din cel puțin 15 elemente repetate, fiecare avînd 80 de nucleotide. Secvența $S\gamma$ are 4 regiuni de 49 de nucleotide, iar $S\varepsilon$, repetiții de 60 de nucleotide. Prezența în structura regiunilor S a unor secvențe-standard YAGGTTA aproape de situsul de recombinare poate determina poziția situsului de joncțiune și legarea, pe bază de complementaritate, a oricărei gene C_H, de regiunea de comutare prezentă între secvența V_H și gena C_H. Aceste recombinări sînt însoțite de deleția regiunii $C\mu$ și a altor regiuni din genom intercalate.

Figura 171 ilustrează comutarea $C\mu \rightarrow C\gamma$, ca un caz particular al mecanismului general de comutare a clasei lanțurilor H, prin care semnalele S mediază recombinarea intracatenară și transferul complexului V/D/J asamblat, înaintea genei $C\mu$, la oricare din genele C_H, cu deleția ADN intercalat. Din figură rezultă că producerea unei gene active $C_H\gamma$ necesită

două evenimente de recombinare : 1) legarea unei regiuni V_H de gena Cμ la nivelul unei regiuni J care o flanchează, permițînd sinteza lanțului Hμ ; 2) aceasta continuă pînă cînd a doua recombinare îndepărtează genele Cμ și Cδ și leagă complexul $V_HD_HJ_H$ al regiunii variabile, format anterior, de semnalul de comutare care precede gena Cγ. Recombinarea poate avea ca suport molecular fie formarea de perechi de baze între secvențele omologe din structura secvențelor-semnal, fie intervenția unor proteine comutatoare, care recunosc și leagă două regiuni S, ce preced gene diferite. Prin acest mecanism se poate realiza comutarea chiar la gene foarte îndepărtate, ca, de exemplu, Cμ → Cα (Shimizu și Honjo, 1984).

Comutarea clasei Ig prin prelucrarea alternativă a ARNm. Early și colab. (1980), precum și Moore și colab. (1981) au descris un mecanism alternativ de comutare a clasei genelor C_H, menit să explice situația particulară a celulelor B mature (Bμ + δ), care produc simultan Ig aparținînd la două clase diferite (IgM și IgD), dar care au aceeași regiune V. Inițial, s-a considerat că acest fenomen ar fi dat de o formă specială de ARNm cu viață lungă, foarte stabil, care persistă în citoplasmă după ce gena activă respectivă a fost eliminată. Analiza genelor clonate prin tehnica ADN recombinant a demonstrat posibilitatea unui proces de maturare a ARN prin „clivare și înnădire” diferențiată la situsuri alternative („Alternative splicing”) pentru a lega aceeași regiune VDJ, fie de regiunea Cμ, fie de regiunea Cδ.

Procesul implică deci o rearanjare prealabilă a ADN, care asigură formarea complexului VDJ, rezultat prin legare combinatorie. După transcriere integrală la o moleculă mare de ARNm premesager (VDJCμCδ) prin clivare diferențiată este eliminată fie secvența Cμ, fie Cδ și se creează posibilitatea sintezei simultane a lanțurilor respective, Hμ și Hδ, avînd aceeași regiune V și deci aceeași specificitate. Hood și colab. (1984) citează cazul unor celule B, care au suferit două comutări succesive de clasă și exprimă simultan sinteza de IgM și IgG, de IgM și IgE sau de IgM și IgA. Aceste situații ar fi expresia unui stadiu tranzitoriu în dezvoltare, prezent înainte ca anticorpul nou sintetizat să înlocuiască IgM originar. Ele demonstrează că orice clasă de Ig poate fi exprimată împreună cu IgM, așa cum s-a demonstrat inițial numai pentru IgM și IgD. Comutarea clasei Ig în aceste cazuri s-ar realiza fie prin transcrierea la o moleculă de ARNm foarte lungă (> 200 Kb în cazul IgM → IgA), fie prin intervenția unui mecanism de transcriere special, încă neidentificat.

După unii autori, în comutarea dintre unele regiuni foarte îndepărtate (μ → α) este improbabil ca ambele regiuni să fie transcrise pe o moleculă unică de ARN nuclear. Ea ar putea implica intervenția prealabilă a unei a doua rearanjări a genelor, care să le aducă în poziții mai apropiate înainte de transcriere. Mecanismul de clivare alternativă este implicat și în formarea Ig secretate și de membrană (vezi fig. 169).

Semnificația biologică generală a geneticii Ig

Sistemul de gene care codifică Ig este singurul cunoscut pînă în prezent, în care două gene structurale discrete participă la formarea unui lanț polipeptidic unic. În felul acesta, cîteva sute de gene din celula em-

brionară pot fi reasortate, pentru a produce milioane sau miliarde de proteine diferite. Deși contravin și infirmă unele dogme fundamentale ale biologiei moleculare, procese similare de reasortare a genelor prin recombinare somatică, transcrierea selectivă și secționare și „înnădire" alternativă a ARN ar putea funcționa pentru a produce diversitate și în alte celule, diferite de limfocite. Mecanismele descrise la Ig ar putea genera proteine, care dispuse pe suprafața celulelor embrionare le-ar „ghida" spre o anumită destinație sau spre un anumit rol într-un organism complex. Demonstrînd potențialul uriaș de amplificare a informației genetice prin reasortarea genelor, sistemul imunitar evidențiază, probabil, un mecanism mai general, cu rol central în dezvoltarea diversității altor sisteme de gene.

Complexul major de histocompatibilitate

„Înțelegerea complexului major de histocompatibilitate, a geneticii sale, a structurii și funcției produșilor săi are o importanță fundamentală pentru studiul imunologiei moderne”

D. H. SACHS

Descoperirea grupelor sanguine și definirea sistemului ABO de către Landsteiner (1900) au atras atenția asupra existenței unor diferențe biologice, determinate genetic, care separă oamenii în „grupe”, după cum posedă sau nu una din variantele sau alelele unei gene. Gorer (1936) demonstrează existența unor deosebiri similare, răspunzătoare de respingerea grefelor la șoarece, cînd acestea provin de la un organism genetic diferit, aparținînd aceleiași specii. El a arătat că rezistența la transplantare este un fenomen imunologic și a confirmat ipoteza lui Haldane (1933) privind prezența unor structuri antigenice, identificabile cu ajutorul antiserurilor, pe suprafața membranelor celulare, diferite pentru fiecare linie genetică pură de șoarece.

Crearea de către Snell (1948) a unor linii de șoareci care diferă prin proprietățile de compatibilitate la alogrefe a permis identificarea genelor care le determină, localizarea prin studii de recombinare genetică și stabilirea funcției lor. El a denumit moleculele de suprafață *antigene răspunzătoare de histocompatibilitate*, iar genele care controlează exprimarea lor, *gene de histocompatibilitate*.

Ulterior, Dausset (1950) a descris prezența pe suprafața leucocitelor a unui sistem de antigene, analog celui ABO sau Rhesus de la hematii, cu deosebirea că are o complexitate extrem de mare. S-a cristalizat astfel ideea că, la animale, soarta transplantelor depinde de existența unui set de locusuri genetice strîns asociate (linkate), cu rol esențial în compatibilitatea țesuturilor, care formează *complexul major de histocompatibilitate* (CMH). Termenul de „complex” este justificat de numărul mare de gene componente, iar cel de „major” de semnificația lui deosebită în realizarea unor funcții imunologice importante : respingerea rapidă a grefelor, stimularea reacției limfocitelor „mixte”, a reacțiilor „grefă contra gazdă”, a limfolizei mediată celular, recunoașterea antigenelor străine și restricția răspunsului imun, reglarea răspunsului imun, recunoașterea și distrugerea celulelor infectate cu virusuri etc.

Importanța CMH este amplificată de demonstrarea faptului că genele localizate la nivelul său participă, în același timp, la producerea răspunsului imun normal, la sinteza unor constituenți esențiali ai sistemului complement, precum și în predispoziția față de unele boli.

După descrierea și analiza CMH de la șoarece, denumit H-2, cel mai mult studiat este cel uman, cunoscut sub numele de HLA. Sisteme si-

milare au fost descrise și la alte animale, fiind notate cu inițiala majusculă a denumirii lor, în limba engleză : cîine DLA („Dog leukocyte antigen"), cobai GLA („Guinea-pig"), iepure RLA („Rabbit"), șobolan RTA („Rat"), cimpanzeu ChLa („Chimpanzee"), maimuța Rhesus RhLA etc.

Terminologia utilizată în studiile referitoare la CMH este complicată de păstrarea unor denumiri cu importanță istorică, de lipsa de uniformitate referitoare la natura unor structuri genetice (regiuni, subregiuni, locus, gene), cît și de nominalizarea diferită a funcțiilor efectuate de produșii genelor respective (tabelul nr. 60).

Tabelul nr. 60

Terminologia utilizată în studiile de histocompatibilitate (în paranteze sînt trecuți termenii nerecomandați în prezent)

Relația genetică dintre organismul receptor și cel donator	Termenul utilizat pentru a identifica animalul	Termenul utilizat pentru a identifica natura grefei
Același animal	Autogen (autolog)	Autotransplant
Aceeași specie + identitate genetică (linii pure, gemeni univitelini)	Singenic (izogenic ; izolog)	Grefă singenică (izotransplant)
Animale din aceeași specie, genetic incompatibile	Alogenic (alomolog)	Grefă alogenică (homogrefă)
Animale din specii diferite	Xenogenic (heterolog)	Xenotransplant (heterotransplant)

Regiunea genetică reprezintă un segment cromosomal distinct, bine definit la ambele extremități datorită posibilității de a-i marca limitele prin recombinări genetice. Corespunde unor segmente majore ale genelor CMH, dispuse linear pe cromosom, în raport cu centromerul. Spre exemplu, regiunile K, I, S, D_L din structura CMH H-2, la șoarece.

Subregiune : termen folosit în accepțiuni diferite. Desemnează, în general, un segment particular din structura unei regiuni. De exemplu, regiunea I, H-2 conține subregiunile B, J, E și C.

Locus (genetic) : termen incomplet definit în acest context și variabil aplicat. *Stricto sensu* corespunde unei gene unice, care codifică sinteza unui singur produs proteic. Termenul este folosit cel mai frecvent pentru fiecare trăsătură unică în cartarea genetică a CMH.

Alele : studiul produșilor genelor CMH în populație a evidențiat prezența unui polimorfism imens. Fenomenul este determinat de existența în populația speciei analizate a unor forme alternative (alele) ale genelor respective.

Haplotip : particularităţi fenotipice determinate de gene strîns linkate pe un singur cromosom, moştenit de la unul din părinţi (respectiv combinaţia de gene prezentă pe unul din cei doi cromosomi).

Locusurile individuale sînt notate cu litere majuscule, urmate de litere mici din alfabetul grec (α, β etc.) sau latin (s, f etc.), sau de cifre arabe (1, 2 etc.). Alegerea literelor are la bază criterii diferite ca : 1) succesiunea alfabetică (A, B, C, E) ; 2) o anumită semnificaţie : a) locusul S codifică o proteină serică ; b) locusurile D şi K, deoarece codifică antigenele descrise iniţial sub denumirile de antigen 4 şi 11 (litera D este a patra, iar K a unsprezecea din alfabet) ; c) o anumită specificitate de suprafaţă ce poate fi definită serologic : Ia1.

Linii genetice de animale de laborator

Deoarece şoarecii „sălbatici" („outbred") din coloniile de animale convenţionale prezintă un grad important de heterozigoţie şi un polimorfism genetic extensiv, cercetările referitoare la problemele de histocompatibilitate au fost efectuate pe trei categorii de animale „construite genetic" în laborator :

1) *Şoarecii din linii pure* („Inbred strains") sînt obţinuţi prin cel puţin 20 de încrucişări frate-soră. Liniile „inbred" prezintă o homozigoţie care depăşeşte 99 % şi exprimă, în general, o singură formă în fiecare tip de antigene CMH. Sînt animale *singenice*, adică animale din aceeaşi specie, identice din punct de vedere genetic (de exemplu, gemeni univitelini sau animale din aceeaşi linie pură). Deoarece atît donatorul, cît şi receptorul au aceleaşi antigene de histocompatibilitate, grefa dintre două animale singenice este acceptată în mod constant.

2) *Şoarecii congenici* sînt construiţi prin încrucişări şi selecţii de la două linii pure distincte, spre exemplu, A şi B. Starea de animal congenic se realizează prin retroîncrucişări între un hibrid F1 şi unul din organismele parentale. Într-o serie de încrucişări succesive, este posibil ca genele complexului H-2 al liniei B să fie „suprapuse" pe genele de fond ale liniei A. La fiecare generaţie, genomul B este redus la jumătate, în aşa fel încît, final, se obţine şoarecele congenic A●B (A reprezintă linia genetică de bază, iar B linia de la care provine complexul H-2). Ca urmare, animalele congenice au genotipuri identice pentru genele CMH, diferind între ele printr-un singur marker, în forma heterozigotă. După Hood (1984), după ~ 12 generaţii, şoarecele congenic are în proporţie de 99,999 % genomul liniei de bază, împreună cu alela H-2 a liniei B.

3) *Şoarecii congenici recombinanţi* sînt produşi prin încrucişarea a două linii de animale congenice, care diferă prin locusul H-2. Spre exemplu, liniile A●B × A ● C. Ocazional apar cromosomi recombinanţi şi, după încrucişări corespunzătoare, se obţin linii de animale congenice recombinante homozigote, care diferă de liniile parentale numai printr-o singură sau prin cîteva gene de histocompatibilililitate.

Structura genetică a complexului major de histocompatibilitate

F. M. Bach și colab. (1972) au demonstrat că proprietățile asociate cu funcția genelor CMH la șoarece și la om sînt determinate de o structură genetică divizibilă. Genele identificate pînă în prezent pot fi grupate, în funcție de natura proteinelor pe care le codifică, de funcția și de distribuția lor în organism, în trei clase, notate I, II și III (fig. 255).

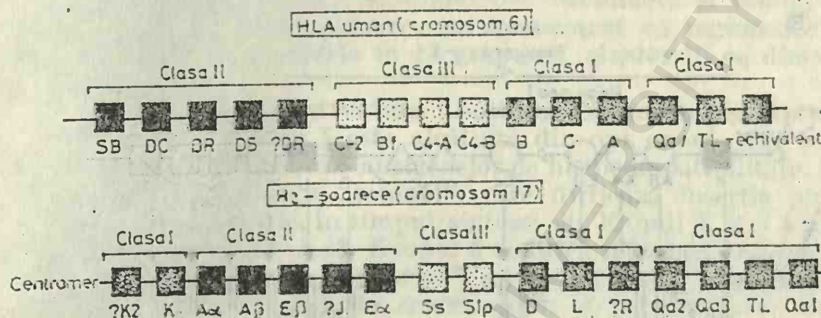


Fig. 255. — Reprezentare schematică a complexului major de histocompatibilitate HLA-uman și H-2 de la șoarece, cu indicarea topografiei genelor din clasele I, II și III.

Complexul major de histocompatibilitate H-2 de la șoarece

CMH a fost definit inițial urmărind fenomenul de respingere a grefelor, cu ajutorul șoarecilor identici sau diferiți genetic. Grefele dintre indivizii identici genetic (singenici) sînt ușor acceptate, în timp ce la șoarecii diferiți (alogenici) sînt respinse.

Progresele biologiei moleculare au permis atît localizarea, cît și cartarea regiunii din genom corespunzătoare genelor CMH. Complexul H-2 de la șoarece este localizat pe brațul scurt al cromosomului 17, la o distanță de ~7 cM* de centromer (punctul de legare a cromosomului în cursul diviziunii celulare). Ele reprezintă ~3% din complementul total de ADN și este suficient de lung pentru a codifica ~200 proteine cu dimensiuni medii (Cunningham, 1977). De aceea, se consideră, în general, că regiunile H-2 conțin, în realitate, un număr mai mare de gene care urmează să fie identificate.

Sistemul CMH de la șoarece poate fi subdivizat în două complexe: 1) *complexul H-2*, denumit astfel pentru că reprezintă al doilea antigen,

* *Centimorgan* = unitate de măsură a distanței dintre două locusuri linkate pe harta fizică cromosomală. Este echivalentă cu o frecvență de recombinare de 1% între genele linkate. Este denumită și *unitate de recombinare* sau *unitate de cartare* („Map unit") și notată cu acronimul cM (Schwartz, 1983). La șoarece, reprezintă ~ 2 000 kb.

definit inițial de Gorer în studiile sale asupra serologiei antigenelor de histocompatibilitate. Este alcătuit din regiunile K, I, S și D ; 2) *complexul Tla* alcătuit din regiunile Qa-2, 3 Tla și Qa-1 (fig. 256). Complexul H-2 este alcătuit din 11 gene, iar complexul Tla, numai din 3.

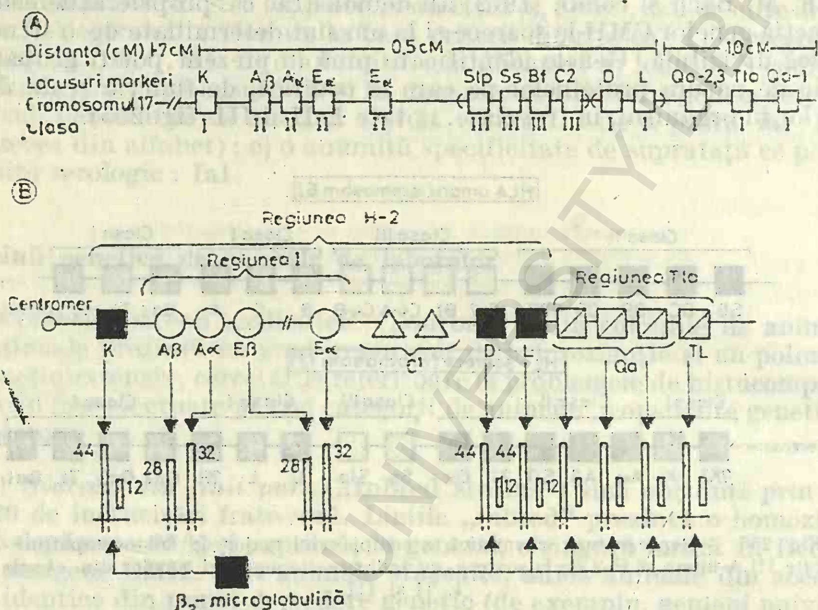


Fig. 256. — Structura genetică a complexului major de histocompatibilitate H-2 la șoarece. A. Harta genetică de ansamblu prezentînd locusurile marker, regiunile, subregiunile și clasele, precum și distanțele în centimorgani (cM). O—centromerul (după Hood și colab., 1984). B. Prezentare simplificată indicînd poziția genelor ce codifică antigenele clasice de transplantare și antigenele Ia. Genele Qa și TL codifică sinteza catenei grele polimorfe a moleculelor clasa I, care se asociază cu β_2-microglobulina. Cifrele reprezintă g.m. în kdal (după Hanson și Wigzell. 1985).

Genele din clasa I

Formează o familie multigenică, din care au fost identificate 6 gene (locusuri) funcționale, corespunzînd moleculelor definite serologic și notate K, D, L, T la, Qa-1 și Qa-2, 3.

Genele K, L și D aparțin complexului H-2 și sînt răspunzătoare de sinteza unor proteine prezente practic pe suprafața tuturor celulelor din organism. Ele sînt cunoscute, în special, sub denumirea de *antigene de transplantare*, pentru că sînt „ținta" reacțiilor de respingere a grefelor, deși au un rol important și în imunitatea antivirală. Exprimarea maximă a antigenelor K și D este prezentă pe celulele limfoide ($10^4 - 10^5$/celulă), iar cea minimă, pe celulele embrionare și pe hematii (Sachs, 1984). Evidențierea unui număr atît de limitat de produși ai regiunilor K și D s-ar putea explica, fie prin faptul că multe din genele acestora nu sînt exprimate, fie că într-un haplotip, genele multiple sînt atît de asemănătoare, încît produșii lor nu pot fi deosebiți.

Genele adiționale Tla, Qa-1 și Qa-2,3 codifică produși cu structură în mare parte analogă celor ale regiunilor K, D, L, dar cu un grad mai mic de polimorfism. După Grubb și Möller (1985), antigenele Tla și Qa nu sînt prezente pe toate celulele nucleate. Ele caracterizează, în mod normal, anumite celule, în anumite stadii de diferențiere. De aceea sînt numite antigene de diferențiere.

Organizarea genelor din clasa I a fost evidențiată prin clonarea unor fragmente de ADN de la șoarece cu ajutorul cosmidelor urmată de analiza fragmentelor și reconstituirea secvenței lor (Steinmetz și colab., 1982). Rezultatele, parțial surprinzătoare, au demonstrat că regiunea clonată conține 36 de gene, repartizate în 13 grupuri („clusters") cu dimensiuni diferite (fig. 257).

Studiul a evidențiat structura discontinuă a genelor și faptul că o genă individuală din clasa I este alcătuită din opt exoni, care codifică diferitele regiuni și domenii ale antigenelor de histocompatibilitate. Astfel, exonul 1 codifică secvența „semnal", care dirijează inserția proteinei în reticulul endoplasmatic, în timpul sintezei ei. Exonii 2, 3 și 4 codifică domeniile externe α1, α2 și α3. Exonul 5 codifică regiunea transmembranară, prin care proteina este „ancorată", iar exonii 6, 7 și 8 codifică regiunea intracitoplasmatică. Relația dintre exoni și proteină este similară celei descrise de Ig-anticorp și pledează pentru originea comună, ancestrală, a celor două sisteme de gene.

Complexul Tla este format din 10 grupuri de gene situate pe harta genetică a cromosomului 17, la dreapta complexului H-2. El codifică o serie de antigene de suprafață celulară, al căror număr, poziție în genom și semnificație funcțională sînt încă incomplet cunoscute.

Genele Tla („*T*hymus *l*eukemia *a*ntigen") codifică antigenele Tl prezente pe suprafața celulelor timice la anumite linii de șoareci normali

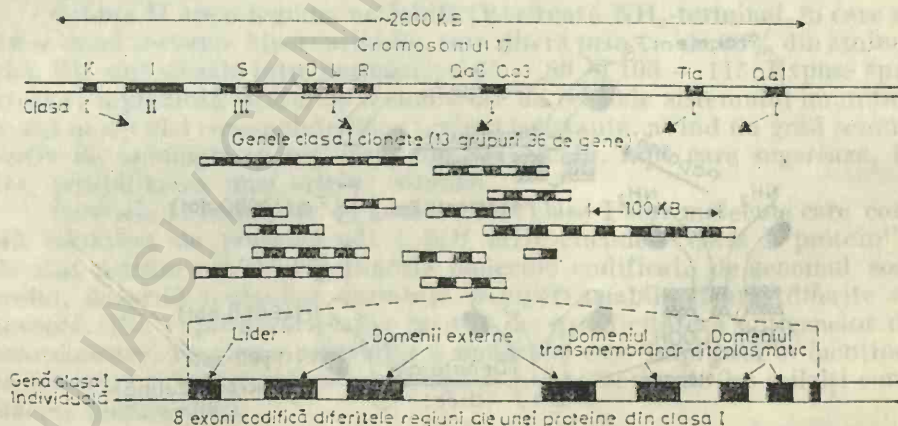


Fig. 257. — Genele care codifică proteinele claselor I, II și III CMH sînt linkate pe cromosomul 17 la șoarece. Cele 36 de gene aparținînd clasei I au fost clonate pe cosmide și s-a demonstrat că sînt asociate în 13 grupuri („Cluster") conținînd un număr variabil de gene.

şi pe celulele T leucemice la aproape toate animalele. Antigenele Tl au multe particularităţi comune cu antigenele H-2K şi H-2D şi sînt formate, ca şi acestea, dintr-o catenă grea H (g.m. ~ 45 000 dal) şi una uşoară, identică cu β-2-microglobulina (Viletta şi Uhr, 1976). Unele gene din această regiune au un rol critic în dezvoltarea embrionară a şoarecelui. Mutaţiile la nivelul lor sînt letale sau urmate de anomalii evidente ale părului şi ale mărimii cozii.

Genele Qa, situate între locusul Tla şi H-2D, ar fi în număr de cinci, notate Qa-1—Qa-5 (Flaherty, 1980). Cele mai cunoscute sînt Qa-1,2 şi 3. Produşii lor au rolul de antigene de diferenţiere hematolimfoidă. Nu se ştie dacă ei sînt produşii unor gene diferite sau dacă corespund unor stadii de diferenţiere a produşilor unei aceleiaşi regiuni. Atît genele Tla, cît şi cele Qa provin, probabil, din aceeaşi genă primordială ca şi genele din clasa I. Produşii lor sînt deci molecule CMH clasa I.

Structura moleculelor din clasa I CMH. Produşii genelor din clasa I CMH, antigenele clasice de transplantare (sau de histocompatibilitate), sînt proteine membranare integrate (g.m. ~ 40 — 45 Kdal). Sînt alcătuite dintr-un polipeptid mai mare (catenă grea H), asociat necovalent cu o moleculă de β-2-microglobulină (catena uşoară, L). Structura moleculară a antigenelor clasa I a fost stabilită prin diferite modalităţi de îndepărtare din membrana celulară. Solubilizarea cu detergent determină extracţia unui dimer, format din două catene polipeptidice lungi (H) şi două uşoare (L), legate covalent. Extracţia cu ajutorul papainei produce un fragment solubil, numit Fs, alcătuit dintr-o parte din catena H (fragmentul F4) şi întreaga catenă uşoară. Fragmentul Fm rămîne asociat cu membrana celulară. În sfîrşit, denaturarea cu uree separă catena L de catena H (fig. 258).

Catenele H au trei domenii extracelulare, fiecare avînd 90 de aminoacizi (~ mărimea unităţilor de omologie din structura Ig), o regiune hidrofobă de 40 de aminoacizi, care traversează membrana celulară (regiunea

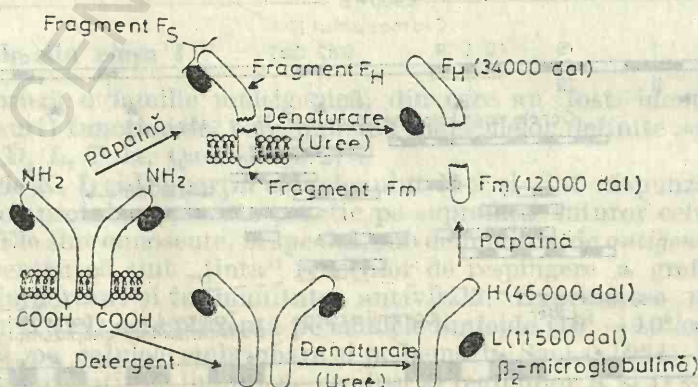


Fig. 258. — Structura moleculelor CMH de clasa I (K, D sau HLA-A, B) determinată prin solubilizare cu detergenţi, clivare enzimatică cu papaină şi denaturare cu uree (după Götze şi Burger, 1986).

sau domeniul transmembranar), şi o „coadă" citoplasmatică de 30 de aminoacizi (fig. 259). Domeniile extracelulare, care reprezintă ~ 80% din întreaga structură, sînt notate de unii autori $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha3$, iar de alţii N, C1 şi C2. Domeniile $\alpha2$ şi $\alpha3$ au cîte o punte S—S intercatenară, situată central, care delimitează o buclă de 60 de aminoacizi (altă asemănare cu Ig). Catenele laterale glucidice sînt legate de primele două domenii externe ($\alpha1$ şi $\alpha2$).

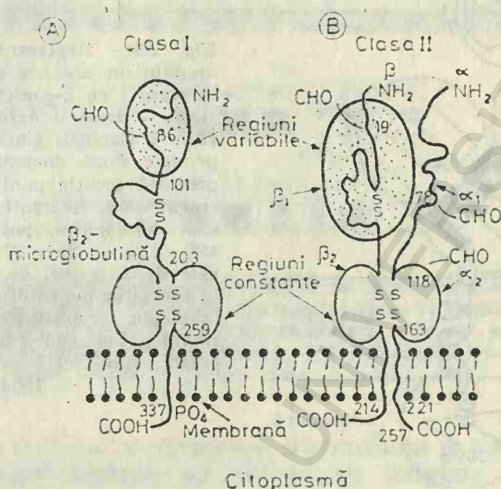


Fig. 259. — Reprezentare schematică a moleculelor codificate de genele CMH. A. Moleculă HLA clasa I. B. Moleculă HLA-DR (după Schwartz, 1984). NH_2 — aminoterminal; COOH — carboxiterminal; CHO — catenă glucidică laterală; PO_4 — fosfat. Numerele indică poziţia resturilor de aminoacizi cu anumite semnificaţii funcţionale.

Catena H are o regiune variabilă (V) situată NH_2-terminal, în care se găsesc două secvenţe hipervariabile, care diferă prin > de 60% din aminoacizi. Ele sînt situate între aminoacizii 65 — 80 şi 105 — 115. Expuse spre exterior, reprezintă situsurile recunoscute de celulele sistemului imunitar. Restul moleculei corespunde unor regiuni constante, avînd un grad semnificativ de omologie cu regiunile similare ale Ig, fapt care sugerează, în plus, posibilitatea unei origini comune.

Catenele H codificate de genele CMH clasa I sînt molecule care conferă calitatea de proteină-self („Self MHC-encoded class I protein"). Ele sînt printre cele mai polimorfe molecule codificate de genomul şoarecelui, datorită regiunilor variabile şi hipervariabile, foarte diferite ca secvenţă. Ele explică varietatea imensă de specificitate a antigenelor de transplantare. Regiunea constantă a moleculei este implicată în menţinerea integrităţii structurale a moleculei şi în interacţiunile cu ceilalţi componenţi membranari.

Beta-2-microglobulina este o proteină foarte omogenă, indiferent de specie. Are 96 de aminoacizi (g.m. ~ 12 000 dal) şi este codificată de cromosomul 2. Descoperită iniţial în urina bolnavilor cu disfuncţii

renale (Bergard și Bearn, 1968), ea seamănă ca mărime cu domeniile Ig și are o secvență foarte înrudită cu regiunea C a acestora. Este codificată, probabil, de o genă derivată din gena ancestrală din care au derivat Ig. Asocierea ei cu antigenele H—2 și HLA sugerează o legătură evolutivă posibilă între Ig—anticorp și antigenele de histocompatibilitate.

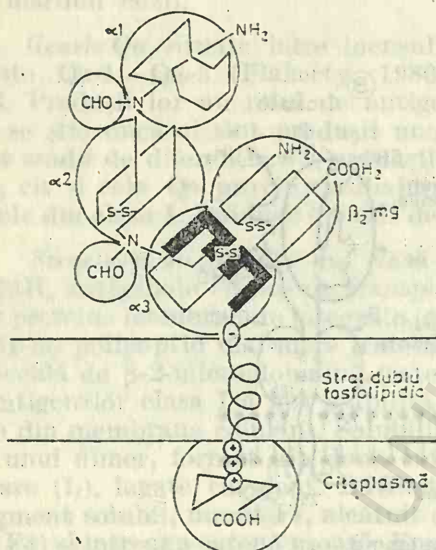


Fig. 260 — Reprezentare schematică a modului de asociere a moleculelor CMH de clasa I cu β-2-microglobulina ; α_1, α_2 și α_3 — domenii externe ale moleculei clasa I. Catenele glucidice sînt legate de primele două domenii externe. Figura prezintă poziția punților disulfidice intracatenare. Regiunile negre din domeniul α3 indică poziția aminoacizilor 199—222 și 254—273, care înconjură cele două resturi de cisteină implicate în formarea punții disulfidice și care au o omologie semnificativă cu domeniile imunoglobulinelor (după Brominger și colab., modificată de Hood și colab., 1984).

Paul (1984) nu exclude nici posibilitatea unei evoluții convergente a genelor pentru Ig, CMH clasa I și β—2-microglobuline, în vederea formării unei structuri corespunzătoare moleculelor membranare de acest tip.

Fig. 260 sugerează că, în ansamblu, antigenele de transplantare au o structură pliată, datorită căreia formează module (perechi de domenii) de tipul α1 — α2 și α3 — β-2-microglobulină. Această asociere este sugerată și de simetria binară a complexului, evidentă în studiile bazate pe difracție în raze X.

Moleculele clasa I CMH sînt prezente practic pe toate celulele, începînd din ziua a 4-a la embrionii de șoarece și pe celulele fetale la om. Densitatea lor la șoarece este foarte diferită. Este maximă pe suprafața limfocitelor. În ficat reprezintă 20%, pe hematii 10%, în rinichi 5%, în mușchi 0,5% și în creer numai 0,1% din concentrația prezentă pe limfocite (Gotze și Burger, 1986).

Regiunea genetică I. Genele din clasa II

Regiunea genetică I, situată la șoarece pe cromosomul 17, între regiunile K și S, conține, după Dausset (1981), trei categorii de gene, diferite funcțional și denumite Ia, Ir și Is. Ea a fost subdivizată prin analiză genetică în 5 subregiuni, notate A, B, J, E și C, dintre care numai două, subregiunile A și E, aparțin clasei II (fig. 261 A). Cele mai studiate gene

din această regiune, care controlează răspunsul imun, au fost numite gene Ir („*I*mune *r*esponse genes"), iar moleculele pe care le codifică, Ia („*I* region *a*ssociated").

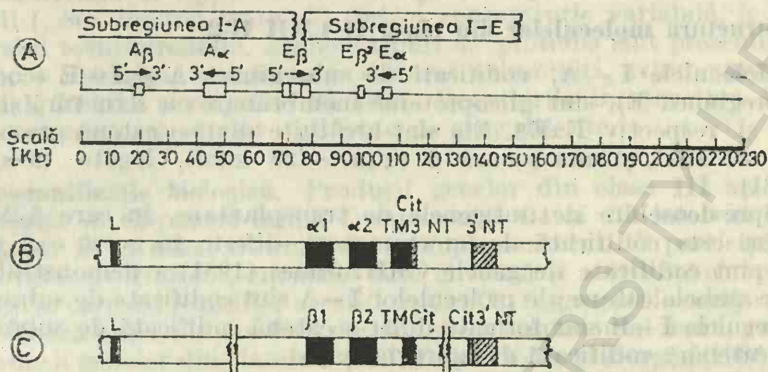


Fig. 261. — Structura genetică a complexului major de histocompatibilitate. A. Harta fizică a regiunii I la șoarecii BALB/c, cu amplasarea genelor clasa II identificate (după Steinmetz și colab., 1982). B, C. Structura genelor α și β din clasa II. L — leader; α_1, α_2, β_1 și β_2 — domeniile externe; TM — domeniul transmembranar; Cit — domeniul citoplasmatic; NT — secvențe netraduse (după Hood și colab., 1984).

Genele Aα și Aβ au o structură discontinuă și sînt formate, fiecare, din cîte cinci exoni separați de introni, cu lungime variabilă (fig. 261 B, C). În ambele gene, primul exon codifică secvența leader, iar exonii 2 și 3 codifică domeniile α1 și α2, respectiv β1 și β2. În cazul genelor Aα, exonul 4 codifică domeniul transmembranar, domeniul citoplasmatic și o porțiune din regiunea 3′ netradusă a ARNm, iar exonul 5, restul acestei regiuni. În cazul genelor Aβ, exonul 4 codifică domeniul transmembranar și o parte din domeniul citoplasmatic, iar exonul 5 restul domeniului citoplasmatic și regiunea 3′ netradusă (Hood și colab., 1984).

Alte gene din regiunea I. Regiunea I conține, pe lîngă genele A și E, aparținînd clasei II, și subregiunile B, J și C, considerate de unii autori ca aparținînd aceleiași clase, datorită localizării lor și asocierii posibile cu reglarea imună. Sachs (1984) propune să fie considerate ca entități separate pînă cînd cunoașterea lor mai aprofundată va permite o clasificare perfect justificată.

Subregiunea B conține un număr de gene a căror prezență este corelată cu un fenotip înalt sau moderat reactiv. Deoarece nu codifică produși identificabili serologic, este probabil că genele ei nu se exprimă structural, ci au mai degrabă un rol de reglare. Deși baza structurală a subregiunii B este necunoscută, Sachs (1984) apreciază că poate fi considerată ca o regiune definită de funcția genelor Ir.

Subregiunea J codifică formarea unor molecule prezente pe suprafața celulelor T_S, greu de studiat, datorită numărului mic de celule de acest tip, în populația limfocitară normală. Rolul lor ar fi important în reglarea răspunsului imun.

Subregiunea C nu are produși caracterizați structural. La nivelul ei ar fi localizate atît gene Ir, cît și gene care codifică determinanți stimulatori ai CMH și cu rol de factori supresori.

Structura moleculelor din clasa II CMH H-2.

Moleculele I — A, codificate de subregiunea A și I—E (codificate de subregiunea E), sînt glicoproteine membranare cu structură dimeră: AαAβ și respectiv EαEβ. Ele sînt alcătuite dintr-o catenă grea (α), cu g.m. ~ 35 kdal, și una ușoară β (g.m. ~ 28 kdal), legate necovalent (fig. 261).

Spre deosebire de antigenele de transplantare, în care β-2-microglobulina este codificată de un cromosom diferit, în acest caz, ambele catene sînt codificate de genele CMH. Jones (1981) a demonstrat că în timp ce ambele catene ale moleculelor I—A sînt codificate de subregiunea A, moleculele I—E sînt formate dintr-o catenă codificată de subregiunea E și o catenă β codificată de subregiunea A.

Genele Aα, Aβ și Eβ, situate în subregiunea I—A, sînt foarte polimorfe, în timp ce gena Eα, localizată în subregiunea I—E, este relativ constantă. În structura moleculelor din clasa II ar exista și un al treilea tip de polipeptid, numit Ii (i = invariant), care ar fi prezent pe suprafața celulelor, asociat polipeptidelor α și β, înainte de unirea lor covalentă. El ar avea rol în maturarea catenelor α și β și în transportul lor la suprafața celulei.

Cele două catene α și β au două domenii extracelulare, notate α1 și α2 și respectiv β1 și β2, lungi de 90 de aminoacizi, o porțiune transmembranară (30 de aminoacizi) și o scurtă „coadă" citoplasmatică (10 — 15 aminoacizi), în porțiunea COOH-terminală. Trei din cele patru domenii externe (α2, β1 și β2) au legături disulfidice (—S—S—) intracatenare, plasate central.

Distribuția antigenelor Ia. Antigenele Ia au o răspîndire mult mai restrînsă comparativ cu cele de transplantare. Ele sînt prezente, în special, pe suprafața celulelor B, a monocitelor și macrofagelor. În cantități mici, pot fi găsite și pe suprafața epiteliului timic, a celulelor Langerhans din piele, a celulelor dendritice, a spermatozoizilor și, în anumite circumstanțe speciale, pe unele celule T_H. În aceste cazuri, nu se știe dacă au o origine endogenă (sînt sintetizate de celulele respective) sau dacă sînt preluate de pe alte celule (Sharrow și colab., 1981). În cazul celulelor timice, prezența lor poate fi rezultatul ambelor căi posibile. Distribuția antigenelor Ia pe diferite celule este, în unele cazuri, mai degrabă cantitativă decît calitativă. Nu se știe dacă prezența lor în cantități infime are o semnificație funcțională sau nu (Paul, 1984).

Genele și moleculele din clasa III

Regiunea S conține genele Ss, Slp, C2 și Bf, care codifică o subpopulație de proteine serice solubile, cunoscute sub denumirea de molecule din clasa III. Cea mai cunoscută, proteina Ss („Serum substance"), a cărei concentrație variază ca o particularitate genetică, a fost identificată cu componentul C4 al complementului de la șoarece. La om este codificată

de două gene strîns adiacente pe cromosomul 6 (apărute prin duplicare), sub forma a două proteine foarte asemănătoare.

La șoarece au fost identificate tot două gene și anume : Ss, care se exprimă normal, și Slp, care codifică o proteină prezentă numai la șoarecii masculi („*S*ex *l*imited *p*rotein"), într-o concentrație variabilă, în funcție de nivelul testosteronului. Ambele tipuri de proteine sînt prezente în ser cu g.m. ~ 210 kdal. Sînt formate din trei subunități, avînd aproximativ 100 kdal, 75 kdal și respectiv 35 kdal. Deosebirile în structura lor primară demonstrează că sînt codificate de gene diferite.

Semnificație biologică. Produșii genelor din clasa III au o mare importanță în răspunsul imun. Componenții C4 și C2 intervin în calea clasică, iar Bf în calea alternativă a complementului. Ei participă la formarea C3-convertazelor, enzimele care clivează și activează componentul C3, ca și în cascada reacțiilor acestui sistem. Or, fragmentele componentului C3 afectează procesele din faza de inducție a răspunsului imun, guvernate de produșii genelor din clasele I și II. După Götze și Burger (1986), moleculele din clasa III ar avea un rol ajutător („helper") și stimulator („enhancer") în special pentru distrugerea și eliminarea bacteriilor și paraziților, și a antigenelor particulare, în general.

Nu se știe dacă genele din clasa III sînt localizate întîmplător în structura genetică a CMH sau dacă această localizare este corelată cu un rol direct sau indirect în funcțiile mediate de acesta.

Complexul major de histocompatibilitate HLA uman

La om, informația genetică pentru CMH este localizată pe brațul scurt al cromozomului 6, la ~ 32 cM de centromer. Ea este prezentă sub forma mai multor locusuri, dispuse în ordinea A, C, B și D/DR. Locusul A este cel mai îndepărtat, iar D/DR cel mai apropiat de centromer. Ansamblul sistemului, împreună cu genele învecinate, formează complexul HLA („Human leukocyte locus A" sau Antigen), numit astfel deoarece identificarea de către Dausset (1956) a fost făcută în cadrul studiilor sale asupra aglutinabilității leucocitelor.

Existența antigenelor HLA poate fi detectată cu ajutorul anticorpilor prezenți în serul femeilor multipare (care fac anticorpi față de antigenele HLA parentale, exprimate pe celulele fătului), în serul provenit de la persoane care au făcut numeroase transfuzii (și au fost expuse la antigenele de pe suprafața leucocitelor donatorului) sau de la voluntarii imunizați cu leucocite străine.

Structura genetică a complexului HLA. Datorită variabilității sale enorme și a dificultăților de studiere la om, harta genetică și unele detalii referitoare la sistemul HLA sînt mai puțin cunoscute și deduse prin extrapolarea, cu prudență, a datelor obținute la șoarece.

Secvența cea mai probabilă a genelor HLA este, după Kissmeyer-Nielsen (1982), A, C, B, D/DR. Gena B ocupă o poziție centrală pe harta regiunii, fiind situată la o distanță ~ egală de gena A și de gena D/DR, respectiv la ~ 0,85 cM (fig. 262). Gena C este situată în imediata apro-

piere a locusului B. Genele care codifică constituenţii sistemului complement (C4F, C4S, C2, Bf) sînt, probabil, intercalate în interiorul complexului HLA. Prezenţa lor şi, probabil, a unor gene de răspuns imun, echivalente genelor Ir de la şoarece, conferă regiunii HLA o importanţă deosebită în reactivitatea imună.

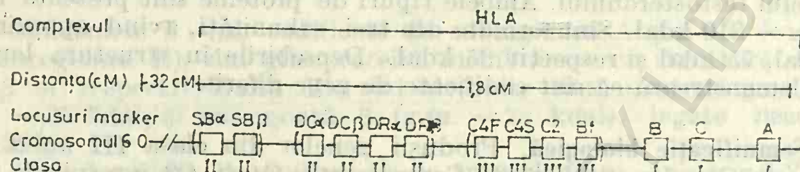


Fig. 262. — Harta genetică a complexului HLA uman situat pe cromosomul 6. Sînt prezentate distanţele în centimorgani, locusurile-marker şi clasele. O = centromerul. Ordinea locusurilor incluse în paranteze este necunoscută (după Hood şi colab., 1984).

Moleculele HLA din clasa I

Genele A, B şi C codifică sinteza unor molecule ubicvitare, prezente practic pe suprafaţa tuturor celulelor nucleate din organism. Aceste molecule (fig. 263 A) sînt caracterizate de Dausset (1981) ca înalt şi uşor modificabile, putînd suferi alterări prin mutaţie, infecţii, interacţiuni cu virusurile sau prin evoluţie, de-a lungul anilor. Datorită polimorfismului lor extrem, aceste molecule sînt un fel de *carnete de identitate biochimică şi genetică* pentru fiecare individ. Acţionînd ca „păzitori ai integrităţii individului", aceste molecule, expuse ca nişte antene pe suprafaţa celulelor, devin „ţinta" sistemului imunitar în trei situaţii :

1) pentru respingerea transplantelor de ţesuturi şi organe, care poartă molecule diferite „incompatibile", ce sînt recunoscute ca străine ;

2) cînd suprafaţa celulelor este modificată de antigene virale, tumorale sau de substanţe chimice. Aceste modificări sînt recunoscute împreună cu moleculele HLA de către celulele T citotoxice, specifice antigenelor respective ;

3) cînd moleculele HLA suferă modificări prin mutaţie (de regulă, erori întîmplătoare de transcriere genetică), devenind astfel „autoţinte" străine, care vor fi eliminate (Dausset, 1982).

Moleculele HLA din clasa II

Regiunea genetică HLA—D (fig. 263 B, C) codifică cel puţin 3 subpopulaţii de produşi, denumite HLA—DR, HLA—DQ (anterior notat DC) şi HLA—DP. Ele au o structură asemănătoare moleculelor din clasa II H-2 (fig. 261 B) de la şoarece. Produşii locusului D/DR nu pot fi identificaţi serologic, ci numai printr-o reacţie celulară a limfocitelor mixte („Mixed lymphocyte reaction sau „response", MLR*),

---

* Cultivarea în comun, *in vitro*, a limfocitelor provenite de la doi indivizi din aceeaşi specie, neînrudiţi genetic, are drept urmare transformarea lor blastică, urmată de proliferare. Procedeul stă la baza reacţiei limfocitelor mixte în culturi („Myxed lymphocyte culture reaction"), în forma sa bidirecţională („Two-way reaction"), în forma sa unidirecţională („One-

de unde şi denumirea de antigene „definite de limfocite". Moleculele HLA—D/DR sînt indispensabile cooperării dintre celulele imunocompetente. Ele asigură interacţiunile dintre monocite, macrofage, celulele B, T_A, T_S, T_C şi plasmocite, fie prin contact direct, fie prin intermediul unor factori solubili.

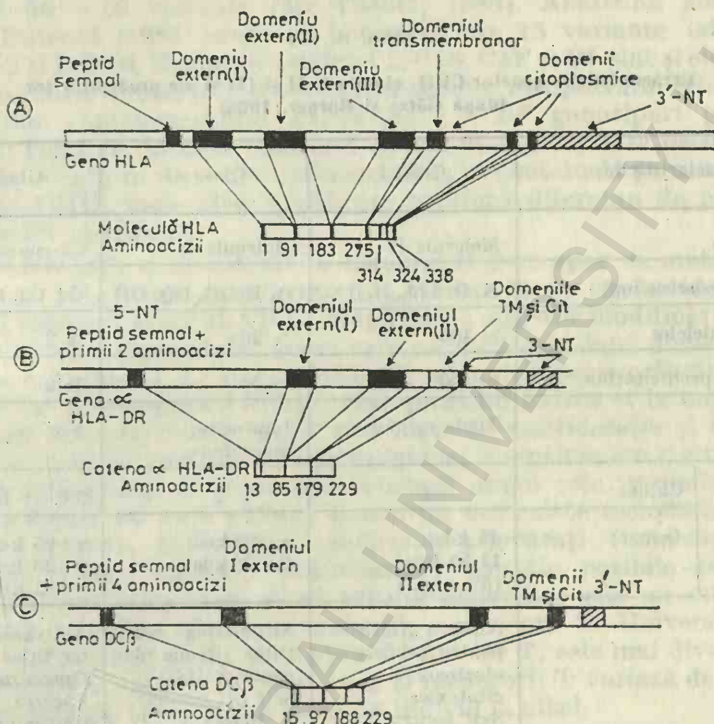


Fig. 263. — Reprezentare schematică a structurii genelor genomice ale CMH, evidenţiind organizarea exonilor şi intronilor, şi a produşilor lor proteici. A. Gena HLA şi molecula HLA, clasa I. B. Gena HLA-DRα şi molecula HLA-DRα, clasa II. C. Gena DCβ şi catena DCβ, clasa II. NT — regiuni netraduse (5' şi 3'); TM — regiunea transmembranară (după Schwartz, 1984).

Transmiterea „mesajului" implică prezenţa antigenului specific faţă de care a fost declanşat răspunsul imun şi specificitatea de „self", în sensul că „limbajul" nu este perceput decît dacă celulele „emiţătoare" şi cele „receptoare" aparţin aceluiaşi organism (restricţie CMH).

Moleculele HLA din clasa III

Aceste molecule sînt produsele genelor C2, C4S, C4F şi Bf, care nu sînt încadrate oficial în structura CMH. Ca şi în cazul celor descrise la şoarece, sînt constituenţi ai sistemului complement (C2, C4 şi B), cu rol

---

way reaction"), una din populaţiile celulare este împiedicată să prolifereze prin tratare cu mitomicină C sau iradiere cu 2 500 r, fiind folosită numai pentru stimularea celulelor normale. Reacţia arată care din cele două populaţii celulare are rol de stimulare. Răspunsul limfocitelor „amestecate" implică intervenţia unor procese de activare, asemănătoare celor observate, spre exemplu, în cursul răspunsului faţă de antigenele virale.

în distrugerea celulelor-ţintă, după fixarea anticorpilor specifici pe suprafaţa acestora şi, implicit, în apărarea organismului.

Tabelul nr. 61 prezintă sintetic proprietăţile genelor şi produşilor CMH, clasele I, II şi III.

Tabelul nr. 61

Caracteristicile genelor CMH, clasele I, II şi III şi ale produşilor lor (după Götze şi Burger, 1986)

Caracteristicile		Clasa I	Clasa II	Clasa III
Denumirea		Molecule H	Molecule Ia	C3-convertază
Locusuri (şoarece/om)		K, D, L/A, B, C	A, E/DR, DQ, DP	C4, C2, BF
Numărul alelelor		> 100	> 20	⩾ 2
Numărul specificităţilor		> 100	> 50	⩾ 2
Distribuţia		Toate celulele	Limfocite, macrofage	Ser
Structura chimică	Catene	2	2	3(C4); 1(C2, B)
	G.m.	45 kdal 11,50 kdal (β2 – μG)	α : 32 kdal β : 28 kdal	α : 95 kdal β : 28 kdal γ : 33 kdal
Fiziologia		Antigen „ţintă" pentru celulele efectoare T citotoxice Self pentru T_C	Stimularea reacţiilor imune alogenice (MLR) Self pt. celulele T helper şi T supresor (interacţiuni T – T, T – B, T – macrofage)	Activarea enzimelor litice Opsonizare, producerea de anafilatoxine, substanţe chemolecucotactice

Moştenirea haplotipului HLA

Haplotipul este definit de combinaţia de alele, la fiecare locus de pe un singur cromozom, moştenit ca o unitate de la unul din părinţi. Luînd în consideraţie haplotipurile a, b, c şi d, se pot constitui haplotipurile de tip matern ab şi cele de tip patern cd. Copiii rezultaţi din această încrucişare (ab × cd) vor moşteni unul din cele două haplotipuri posibile, de la fiecare părinte. Ei vor avea haplotipurile ac, ad, bc sau bd. În cazul existenţei a doi descendenţi există o şansă de 25% ca ei să fie identici (ac şi ac), 25% să fie complet diferiţi (ac şi bd) şi o şansă de 50% să fie HLA semi-identici (ac şi ad).

Polimorfismul genelor CMH și consecințele sale

Numeroase observații scot în evidență marea varietate a genelor MHC la șoarece. Unele gene din clasa II au 10 — 15 variante, iar cele din clasa I 30 — 50 variante (Mc Devitt, 1983). Analizînd polimorfismul HLA, Dausset (1981) arată că locusul A are 15 variante (alele), B 37, C8, D 12 și DR 10. Regiunile pentru C2, C4S, C4F și Bf sînt și ele polimorfe, în așa fel încît numai prin diversitatea genelor complexului HLA și a componenților complementului există $\sim 1 \times 10^9$ genotipuri posibile. În plus, în timp ce, în mod obișnuit, alelele unei gene date determină diferențe de $\sim 1\%$ în secvența aminoacizilor, în proteinele pe care le codifică în cazul CMH, moleculele codificate prezintă diferențe de pînă la 40% aminoacizi modificați.

Diferențele demonstrate în sistemul H-2 nu apar ca mutații punctiforme, ci sub forma unor grupuri („clusters") de nucleotide modificate într-un segment scurt al ADN. Majoritatea acestor modificări sînt localizate la nivelul segmentelor genei care codifică cele două domenii (regiuni) externe extreme (J. L. Marx, 1983). Se adaugă și polimorfismul sistemelor minore de histocompatibilitate, care probabil există și la om (la șoarece numărul lor este > 30). Dacă sînt luate în considerație și alte sisteme genetice, care au variante (grupe sanguine, izoenzime etc.), cît și faptul că o proporție destul de mare din genomul uman este, probabil, polimorf rezultă faptul că nu a existat și nici nu vor exista niciodată doi indivizi identici genetic, cu excepția gemenilor adevărați (monozigoți). După Dausset (1981), numărul combinațiilor teoretic posibile este de 10^{90}, respectiv mai mare decît cel al tuturor oamenilor care au existat și decît numărul atomilor din toate galaxiile cunoscute în Univers. Proteinele CMH sînt, alături de Ig și receptorii celulelor T, cele mai diverse proteine cunoscute din natură. În timp ce Ig și receptorii T variază de la o celulă la alta, proteinele CMH diferă de la un individ la altul.

Studiul structurii antigenelor de transplantare a evidențiat prezența a două tipuri de determinanți antigenici :

1) *Antigene „particulare"* sau *individuale* („Private antigens"), riguros caracteristice pentru un anumit haplotip. Pot fi detectate pe suprafața celulelor utilizate la prepararea unui antiser, numai după ce acesta a fost absorbit cu toate tipurile de celule cu care reacționează încrucișat.

2) *Antigene „publice"* prezente pe suprafața celulelor, aparținînd mai multor linii genetice diferite. Ele determină reacții serologice încrucișate (fig. 264).

Complexele minore de histocompatibilitate

Studiul respingerii țesuturilor sau organelor transplantate sugerează existența, la toate speciile testate, a două tipuri de gene de histocompatibilitate. Genele complexului major de histocompatibilitate codifică antigene capabile să determine respingerea rapidă a grefelor (în 10 — 14

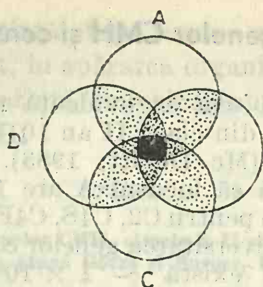


Fig. 264. — Reprezentare schematică a reacțiilor încrucișate dintre patru haplotipuri ipotetice diferite (A—D). Setul de determinanți ce caracterizează fiecare haplotip este reprezentat printr-un cerc. Spațiile albe ale fiecărui cerc reprezintă determinanții particulari (individuali). Spațiile cu puncte rare și cele cu puncte dese sînt comune (pentru două și respectiv pentru trei haplotipuri). În negru, determinanții comuni celor patru haplotipuri (după Hood și colab., 1984).

zile). Genele complexelor minore de histocompatibilitate codifică antigene de histocompatibilitate „slabe", care determină respingerea grefelor în ~ 200 de zile.

Antigenele minore, prezente pe suprafața celulelor au un polimorfism limitat și pot fi uneori specifice de țesut sau de sex. Ele sînt totuși importante din punct de vedere practic, deoarece pot fi ținta unor fenomene de respingere a grefelor de țesuturi sau organe. La șoarece au fost identificate mai mult de 30 de gene „minore" de histocompatibilitate. Un antigen de histocompatibilitate „minor" important este legat de sex. El este răspunzător de faptul că șoarecii — femele, aparținînd anumitor linii pure, resping grefele de piele provenite de la șoarecii—masculi. Respingerea este determinată de antigenul H—Y, localizat pe cromozomul Y. Moleculele care poartă determinantul H—Y ar avea, probabil, în mod normal, un rol important în organizarea embriologică și în dezvoltarea testiculelor.

Rolul moleculelor codificate de CMH în răspunsul imun

Numeroase cercetări, efectuate în special în ultimele două decenii, au evidențiat rolul esențial al genelor și al produșilor CMH în inducția și desfășurarea răspunsului imun (tabelul nr. 62).

Contribuția moleculelor CMH în recunoașterea antigenului străin

Răspunsul imun este rezultatul unor interacțiuni complexe între celulele care „prezintă" antigenele (macrofage) și limfocitele T și B. Aceste interacțiuni celulare esențiale reprezintă mecanismul major de reglare a procesului de recunoaștere imunitar. S-a demonstrat că, spre deosebire de celulele B, care pot recunoaște anumite antigene în stare liberă, celulele T sînt incapabile să recunoască antigenele străine ca atare. Atît celulele T_H, cît și celulele T_C recunosc antigenele numai dacă sînt „prezentate" de

Tabelul nr. 62

Rolul genelor K, D, A, E, și S din complexul H-2 de la șoarece, în cursul răspunsului imun

Denumirea și clasa genei	Celulele cu care interacționează	Celulele efectoare	Efectul în răspunsul imun	Sistemul imunitar afectat
K, D (Clasa I)	T_H, macrofage	T_C (Killer)	Citotoxicitate mediată celular; respingere de grefe	Imunitatea mediată celular
A, E (Clasa II)	T_H, T_S macrofage	Limfocite B, plasmocite	Biosinteză de Ig-anticorp	Imunitatea mediată umoral
S (Clasa III)	Monocite macrofage, complexe antigen--anticorp	Componenții C4 și C2, factorul B al sistemului complement	Fagocitoză, opsonizare, chemotaxie, liză	Sistemul auxiliar

o celulă care le-a preluat și „prelucrat", în asociere cu o proteină codificată de CMH, care are semnificația de marker „propriu" („Self-marking molecules"), deoarece servește ca un sistem de identificare a celulelor proprii.

Fenomenul de „recunoaștere asociată" are două implicații majore:

1) Celulele sistemului imunitar nu interacționează cu proteina-self decît dacă aceasta este asociată cu un determinant antigenic străin (antigene virale, antigene tumorale etc.);

2) Recunoașterea este condiționată de existența unei histocompatibilități între celulele care interacționează: spre exemplu, macrofagele care „prezintă" antigenul și celulele T_H sau T_C trebuie să poarte aceeași moleculă CMH-self, respectiv să aparțină aceluiași organism. Fenomenul a fost descris sub denumirea de *limitare a interacțiunilor celulare prin histocompatibilitate*(„Histocompatibility restriction of cellular interactions") sau, mai pe scurt, „restricție CMH". Controlînd etapa de recunoaștere a răspunsului imun, acest fenomen controlează, în același timp, imunitatea mediată umoral și imunitatea mediată celular.

În acest context, moleculele din clasa I sînt implicate în procesele de recunoaștere a macrofagelor, celulelor T_H și T_C, și în controlul interacțiunilor dintre celulele efectoare (T_C și celule-țintă). (fig. 265). Ele participă direct în imunitatea mediată celular. Moleculele din clasa II participă în recunoașterea antigenelor de către celulele T_H, în interacțiunile dintre celulele T și macrofage, și în cooperarea T — B.

Rolul moleculelor CMH în respingerea transplantelor de țesuturi și organe

Moleculele clasa I (produse de genele HLA-A, HLA-B și HLA-C la om (respectiv H-2K, H-2D și H-2L la șoarece) corespund antigenelor de transplantare, capabile să inducă respingerea rapidă, viguroasă, a țesuturilor grefate. Ele marchează pe suprafața fiecărei celule identitatea

imunologică și genetică, respectiv caracterul „propriu" (self) al oricărui organism individual. Ele datorează această particularitate caracterului unic al secvenței aminoacizilor din structura lor și motivelor arhitecturale rezultate din plierea lor în spațiu. Celulele și moleculele sistemului imunitar recunosc particularitățile individuale ale fiecărei molecule clasa I CMH, datorită unei combinații particulare, caracteristice, de antigene individuale și comune. Deși cunoștințele privind diversitatea lor sînt foarte incomplete, unii cercetători apreciază că numărul posibil de haplotipuri diferite (combinații de alele prezente pe unul din cei doi cromosomi) ar putea fi de ordinul a zece miliarde (Grubb și Möller, 1985). Acest polimorfism imens explică și dificultatea de a găsi indivizi neînrudiți, care să aibă aceeași structură a antigenelor HLA.

Rolul moleculelor CMH în apărarea antivirală

Cercetările lui Zinkernagel și Doherty (1974) (vezi cap. „Răspunsul imun") au demonstrat că moleculele descrise inițial numai ca antigene de transplantare au o funcție biologică esențială, legată de fenomenul de citoliză, mediată de celulele T_C, a celulelor infectate cu virusuri (fig. 265 A). Citoliza apare ca un răspuns imun specific, în care antigenul viral singur nu este suficient pentru a produce liza. Ea necesită intervenția unor celule T_C specifice pentru un anumit virus, care au un haplotip identic cu cel al celulelor-țintă, respectiv dacă atît celulele T_C, cît și

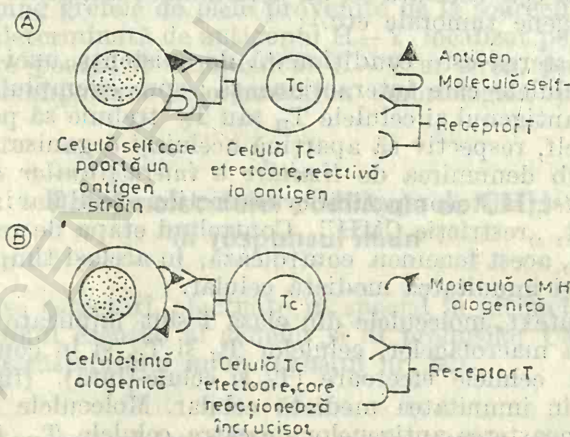


Fig. 265. — Reprezentare schematică a fenomenelor de recunoaștere de către celulele T_C efectoare a unor celule self care poartă antigene străine (A) și a unor celule-țintă alogenice (B) (după Hood și colab., 1984).

celulele-țintă provin de la aceeași linie pură de șoarece. Prin acest mecanism, moleculele CMH clasa I controlează interacțiunea dintre celulele T_C efectoare și celula-„țintă" infectată cu virus.

Funcțiile moleculelor din clasa II
Genele Ir și moleculele Ia

Regiunea genetică I („Immunity") este caracterizată printr-un pleiotropism foarte marcat, decurgînd din faptul că ea controlează mai multe particularități aparent neînrudite. Acest fapt, mai degrabă mărește confuzia asupra rolului ei decît să o clarifice (Watson, 1984).

Katz (1984), sintetizînd semnificația regiunii I H-2 de la șoarece, ia în considerare 6 categorii funcționale de gene:

1) genele Ir, care determină sensibilitatea individuală diferită la boli, prin reglarea capacității de a răspunde la anumite antigene și virusuri;

2) genele ce codifică moleculele care acționează ca elemente de restricție în recunoașterea self — nonself și în interacțiunile dintre celulele T și macrofage, și în cooperarea T — B;

3) genele care codifică antigenele răspunzătoare de reactivitatea limfocitelor mixte (MLR) și de reacțiile grefă contra gazdă;

4) genele implicate în sinteza anumitor mediatori biologic activi, produși de și activi pe celulele T, B și macrofage;

5) genele care determină sensibilitatea la boli alergice și autoimune sau rezistența la anumite virusuri, prin procese care pot fi corelate cu funcțiile genelor Ir și/sau ale celor de interacțiune celulară;

6) genele cu rol în diferențierea celulelor imunocompetente înainte de contactul cu antigenele.

Rolul genelor Ir și al produșilor lor. Numeroase observații clinice și experimentale au evidențiat relația dintre constituția genetică a unui individ și capacitatea sa de a produce un răspuns imun eficient, precum și frecvența deosebită a unor boli infecțioase în anumite familii. Experimental, s-a demonstrat că există linii de șoareci care nu răspund la anumite antigene polipeptidice sintetice simple, la care alte linii răspund viguros. Benacerraf (1967), precum și Mc Devitt (1967) au demonstrat existența unei capacități și respectiv incapacități determinate genetic de a răspunde la un antigen dat. Experimental s-a demonstrat că, în anumite cazuri, șoarecii incapabili de răspuns, proveniți din două linii genetice, pot produce prin încrucișare în F1 un hibrid care reacționează normal față de același antigen. S-a demonstrat prin metode biochimice și biologice că, în aceste cazuri, una din tulpinile parentale era lipsită de o genă α funcțională, iar cealaltă de gena β. Încrucișarea remedia defectele genetice complementare, permițînd sinteza unei molecule din clasa II CMH, funcționale și, odată cu aceasta, posibilitatea de a răspunde eficient față de antigenul respectiv. Genele care controlează acest gen de reactivitate imună au fost numite *gene Ir* („Immune response"), iar ulterior s-a demonstrat că sînt localizate în regiunea I a CMH, corespunzător locusurilor I—A și I—E.

După Götze şi Burger (1986), animalele care posedă o anumită alelă („Responder") de reactivitate sînt capabile să producă anticorpi faţă de antigenele T-dependente şi să dezvolte un răspuns imun dependent de celulele T (respectiv să asigure proliferarea celulelor T, producerea de limfokine şi apariţia reacţiilor de hipersensibilitate de tip întîrziat). Animalele care nu au alela respectivă („Non-Responder") sînt incapabile de un răspuns imun specific.

Genele Ir au următoarele caracteristici generale:

1) sînt localizate în regiunea I a CMH;

2) sînt moştenite ca un caracter dominant autosomal;

3) influenţează în mod selectiv, în funcţie de structura unui antigen dat, capacitatea de răspuns imun. O modificare minimă în structura antigenului (substituirea unui aminoacid într-o catenă laterală a unui polipeptid) poate determina comutarea răspunsului imun, de la reactiv la areactiv;

4) afectează numai răspunsul în anticorpi faţă de antigenele timus-dependente;

5) controlează răspunsul imun specific dependent de celulele T;

6) prezenţa lor este asociată cu exprimarea unor determinanţi antigenici Ia (Götze şi Burger, 1986).

După Hood şi colab. (1984), genele Ir afectează exclusiv răspunsul imun dependent de celulele T. Acest răspuns este definit ca intens sau slab, iar diferitele linii de şoarece au fost clasificate ca „bune" sau „rele", răspunzătoare la răspunsul imun. Spre exemplu, la şoarece, un răspuns imun intens este asociat cu sinteza unei cantităţi de 10—20 de ori mai mare de anticorpi decît în răspunsul slab (fig. 266). Grefa de gene „bune" pentru răspunsul imun restabileşte această capacitate la şoarecii care nu au avut-o iniţial (Mathys, 1985).

Reglarea răspunsului imun de către genele Ir se realizează prin intermediul interacţiunilor dintre celulele T şi macrofage sau dintre limfocitele T şi B. Dovada o constituie faptul că animalele „reactive" (care produc, în mod normal, IgM şi IgG) se comportă, dacă sînt timectomizate, la fel ca animalele areactive („Non-responders"), adică produc numai IgM (fig. 267). Dacă animalele areactive sînt imunizate cu un antigen legat de o moleculă-purtător („Carrier"), răspunsul imun este de tip normal. Mecanismul molecular intim al intervenţiei genelor Ir este necunoscut.

Lipsa de reactivitate faţă de un anumit determinant antigenic poate fi dată, în unele cazuri, de absenţa unei anumite secvenţe din molecula clasa II CMH, care o împiedică să se asocieze cu determinantul antigenic străin şi să formeze sistemul molecular imunogen antigen străin — moleculă CMH, recunoscut de celulele T. Alternativ, sistemul imunitar poate fi lipsit de celule T imunocompetente, capabile să reacţioneze cu complexul antigen — CMH creat sau parţial „oarbe" la anumite combinaţii de determinanţi antigenici şi CMH. După expresia lui Grubb şi Möller (1985),

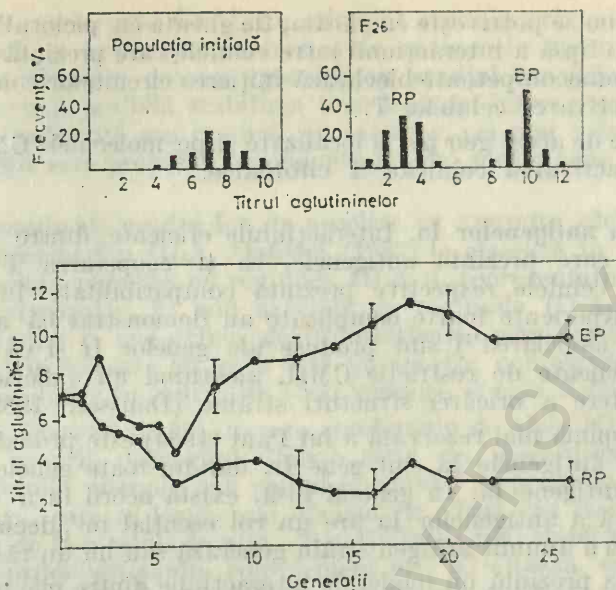


Fig. 266. — Selecția șoarecilor „buni" și „răi" producători de anticorpi față de hematiile de berbec (după Biozzi și colab., 1974).

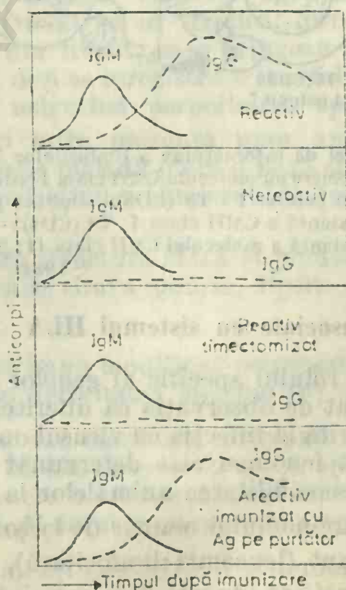


Fig. 267. — Rolul genelor Ir în formarea anticorpilor. Animalele reactive produc un răspuns normal (IgG și IgM), cele nereactive numai IgM. După timectomie, animalele care răspund normal se comportă ca areactive. Animalele nereactive imunizate cu antigenul legat de un purtător produc un răspuns normal (IgM + IgG) (după Götze și Burger, 1986).

„fie piciorul nu se potriveşte cu gheata, fie gheata cu piciorul". În ambele cazuri însă, o lipsă a interacţiunii între celulele care prezintă antigenele şi celulele T-imunocompetente blochează iniţierea circuitelor complexe determinate de activarea celulelor T.

Defecte de acest gen pot fi localizate şi pe moleculele CMH din clasa I, afectînd activarea celulelor T citotoxice.

Funcţia antigenelor Ia. Interacţiunile eficiente dintre celulele T şi macrofagele care prezintă antigenele, ca şi cooperarea T — B au loc numai dacă celulele respective prezintă compatibilitate în regiunea I. O serie de experienţe foarte complicate au demonstrat că antigenele Ia („Immunity associated") sînt produse ale genelor Ir şi că ele funcţionează ca elemente de restricţie CMH, alcătuind un „dicţionar" cu rol de recunoaştere a oricărei structuri străine (Dausset, 1982).

După opinia mai rezervată a lui Paul (1984) este probabil că genele care codifică antigenele Ia sînt gene Ir, dar nu toate genele Ir codifică obligatoriu antigene Ia. În general însă, există acord în a considera că structura fină a antigenelor Ia are un rol esenţial în „decizia" organismului, dacă un anumit antigen străin generază sau nu un răspuns imun.

Fig. 268 prezintă un model de interacţiune dintre macrofag (celulă-ţintă), care prezintă antigenul, în asociere cu moleculele CMH, limfocitele T_H şi T_C.

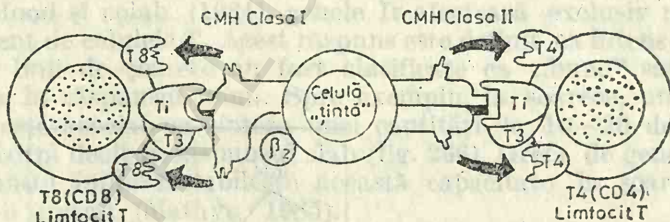


Fig. 268. — Model de interacţiune a limfocitelor T cu antigenul prezentat de celula-„ţintă" (macrofag), în asociere cu molecula CMH clasa I (stînga) sau clasa II (dreapta); Ti/T3 — receptor de antigen al celulei T; T8 (CD8) — marker pentru celulele T_C/T_S, care interacţionează cu o regiune constantă a CMH clasa I; T4 (CD4) — marker pentru celulele T_H, interacţionînd cu o regiune constantă a moleculei CMH clasa II; β-2-microglobulină (după Reinherz şi colab., 1984).

Bolile asociate cu sistemul HLA

Studiul rolului specific al genelor CMH în anumite stări patologice a fost stimulat de observaţia că diferitele linii pure de şoarece au o sensibilitate diferită la infecţia cu virusul oncogen Gross. Ulterior s-a demonstrat că acest fenomen este determinat de genele complexului H-2, care influenţează sensibilitatea animalelor la mai multe virusuri ca: virusul Bittner (al carcinomului mamar de la şoarece), virusul Friend (eritremie), virusul Tennant (leucemia limfocitară), virusul choriomeningitei limfocitare, al vaccinei etc. Aceste date, asociate faptului că răspunsul imun este

controlat de unele gene CMH, au stimulat studiile privind relația dintre anumite boli și haplotipurile (respectiv antigenele specifice) HLA. Ca urmare, în ultimele decenii, paralel cu studiul funcțiilor normale ale CMH, a devenit posibilă stabilirea unei legături între prezența unor boli cu evoluție subacută sau cronică, cu caracter, cel mai adesea, familial, a căror apariție este probabil dependentă de mai multe gene și/sau factori de mediu.

În funcție de gradul lor de asociere cu anumite alele sau haplotipuri ale complexului HLA, Dausset (1982) le clasează în trei categorii: 1) boli asociate puternic cu regiunea HLA-B, reprezentate de mai multe tipuri de artropatii; 2) boli asociate cu regiunile HLA-B și HLA-D: boli autoimune și endocrine, gastrointestinale, neurologice și dermatologice; 3) boli asociate cu gène care nu aparțin complexului HLA, dar care sînt localizate în cadrul lui (boli hepatice și prin deficit imun).

După Dausset (1982), fiecare combinație de alele HLA are calități și defecte proprii, decurgînd dintr-o serie de mecanisme posibile ca: 1) interacțiunile sinergice sau complementare; 2) prezența unor molecule de suprafață, care se leagă mai eficient de virus sau transmit mai ușor informația de la o celulă la alta; 3) activitatea mai slabă sau mai intensă a componenților sistemului complement etc. El citează, ca exemplu, secvența [A1, B8, BfS, Dw3 și DR3], care asigură posibilitatea unui răspuns imun umoral intens, protejînd de acțiunea unor agenți patogeni extracelulari, dar care creează predispoziție la reacții de autoimunitate și la boli ca: miastenia gravis, Addison, Basedow sau diabet juvenil insulinodependent. Prin contrast, formula [A3, B7 Dw2, DRw2] protejează de diabet, dar mărește predispoziția la scleroză în plăci și la un răspuns slab în anticorpi.

Polimorfismul imens CMH explică rezistența diferită față de unele infecții. Astfel, după Dausset (1982), el ar explica, între altele, faptul că în cursul epidemiilor grave din trecut, care atingeau grupuri umane izolate, deci relativ consanguine, deși se înregistra o mortalitate extrem de ridicată, unii indivizi scăpau, asigurînd perpetuarea speciei.

Descoperirea unei legături între prezența unor anumite alele în structura sistemului HLA și diferite maladii oferă o bază științifică, legată de o predispoziție genetică pentru noțiunea cunoscută în trecut sub denumirea de *teren*.

Mecanismele asocierii dintre structura HLA și predispoziția la anumite boli nu se cunosc. Au fost emise cîteva ipoteze, lipsite de o bază experimentală, care implică:

1) intervenția unui răspuns imun modificat (supresat sau exagerat), ca rezultat al unei perturbări în activitatea genelor Ir;

2) existența unei asemănări sau identități între epitopii unor agenți patogeni (de exemplu, proteina M din *Streptococcus*) cu epitopii anumitor alele HLA. Acest fenomen ar genera o toleranță a agentului patogen care mimează structura moleculară („Molecular mimicry") a epitopului HLA;

3) codificarea unor componenți defectivi ai sistemului complement de către genele care controlează exprimarea acestora.

Götze și Burger (1986) sintetizează astfel importanța descoperirii relației dintre sistemul HLA și anumite boli:

1) Cunoașterea tipului HLA are importanță pentru diagnostic, prognostic și tratament, în special în faza precoce a bolii. Astfel, spre exemplu, bolnavii HLA-A9 și/sau HLA-A2 pozitivi par să aibă un prognostic mai bun de supraviețuire decît cei care nu au aceste alele.

2) Determinarea structurii HLA la membrii familiei bolnavilor permite aprecierea riscului de îmbolnăvire și dă informații valoroase pentru profilaxie (de exemplu, prin vaccinare) și pentru sfat genetic.

3) Întrucît nu toate persoanele care suferă de aceste boli specifice prezintă o asociere cu anumite alele HLA, se demonstrează că anumite maladii, considerate ca entități unitare, pot fi subdivizate, în funcție de prezența sau de absența asocierii HLA. Această disociere furnizează informații importante privind etiologia, patogeneza, tratamentul, prognoza și chiar profilaxia bolilor respective.

Importanța restricției CMH pentru apărarea gazdei

Limfocitele B au evoluat ca un sistem celular care, dispunînd de receptori de tip Ig, poate recunoaște și lega antigenele libere, declanșînd astfel procesul de expansiune clonală, de diferențiere și de producere de anticorpi. Prin contrast, celulele T au evoluat ca un sistem foarte complicat, incapabil să recunoască antigenele libere, ci numai atunci cînd se găsesc în asociere strînsă cu proteinele self-CMH, pe suprafața unei celule-„țintă".

Consecințele sînt multiple. Astfel, celulele T_C (citolitice) au o capacitate foarte slabă sau cel mai adesea nulă de a recunoaște virusurile sau fragmentele de proteine virale libere în circulație, deși acestea au caracter nonself. Legarea virusului liber ar fi oricum un proces ineficient. Esențială pentru imunitatea antivirală este distrugerea timpurie a celulelor infectate cu virus, împiedicarea replicării lui și diseminării la alte celule sensibile din organism. Or, după cum s-a demonstrat, receptorul celulelor T_C este astfel construit încît recunoaște cu promptitudine și se leagă eficient de antigenul viral, numai cînd acesta se găsește pe suprafața unei celule în asociere cu o proteină-self codificată de CMH. Mecanismul este foarte eficient, deoarece asigură dirijarea sau focalizarea celulelor T numai spre celulele-țintă, în care virusul se află intracelular. În absența lor, resursele de apărare ale celulelor T_C ar fi irosite (Marrack și Kappler, 1986).

În mod asemănător, celulele T_H nu recunosc antigenul străin *per se*, ci numai în asociere cu antigenele self Ia de pe suprafața macrofagelor, care au preluat antigenele din circulație, le-au „prelucrat" și le „prezintă" pe suprafața membranei lor. În felul acesta, interacțiunile cooperante sînt facilitate, iar eliberarea de limfokine și, în general, de factori activatori și stimulatori are loc numai în apropierea celulelor răspunzătoare de reacțiile specifice de apărare. Este evident că, spre exemplu, dacă eliberarea limfokinelor sau a altor factori activatori s-ar realiza sub influența

unor fragmente de antigene libere, ar fi total ineficientă, deoarece, pe măsura formării lor, s-ar dilua în sîngele circulant.

Rezultă deci că sistemul imunitar a evoluat în așa fel încît ambele clase de proteine (I și II), codificate de genele CMH servesc ca „indicatoare rutiere" („Sign-posts") pentru celulele T, „ghidîndu-le" spre antigen și precizînd locurile unde pot fi mai eficiente (Marrack și Kappler, 1986). În același timp, mecanismul descris reprezintă un sistem de siguranță, un mecanism subtil de control, datorită căruia distrugerea unei celule-„țintă" de către celulele „ucigașe" nu este posibilă decît dacă „ținta" poartă o „marcă" individuală, comună cu celula efectoare. De asemenea, în cazul celulelor T_{H}, mesajul care trebuie să ducă final la eliminarea antigenului străin nu este transmis de la o celulă a sistemului imunitar la alta decît în prezența unui marker-self comun, care acționează ca un cuvînt de trecere, ca o parolă (Dausset, 1982).

Este probabil că mecanisme asemănătoare, încă nedescoperite, ar putea asigura cooperarea altor celule (hepatice, nervoase etc.), permițînd funcționarea armonioasă a milioanelor de celule din organismele pluricelulare. Particularitățile descrise plasează funcțiile CMH, nu numai în centrul apărării individuale, ci al speciei însăși.

Semnificația biologică generală a complexului major de histocompatibilitate

Importanța CMH, considerat inițial numai ca suport genetic al respingerii grefelor la om și al apărării pe această cale a integrității genetice individuale, a crescut considerabil, odată cu demonstrarea rolului său esențial în controlul fenomenelor de bază ale răspunsului imun. Transplantul de țesuturi este foarte rar în natură, în timp ce organismele umane sau animale sînt confruntate permanent cu diferite procese, care necesită intervenția unui răspuns imun. În afara agresiunilor externe, determinate de agenți infecțioși (virusuri, bacterii, protozoare etc.), organismele animale sînt nevoite să se apere de anomaliile propriilor lor celule.

După teoria supravegherii imunologice, diferitele perturbări ale activităților celulare, de la simple mutații care se însoțesc de modificări în structura suprafețelor celulare pînă la transformarea malignă, pot fi recunoscute de sistemul imunitar, respectiv de limfocitele circulante, care „supraveghează" permanent starea celulelor organismului. Cînd întîlnesc o celulă modificată, dincolo de o anumită limită, ele o recunosc ca străină, o atacă și o distrug, așa cum distrug celulele realmente străine în cursul respingerii grefelor alogenice.

Ultimele două decenii au consolidat concepția că genele CMH reprezintă o unitate genetică funcțională ce acționează sinergic, ca o „supergenă" (Dausset, 1982), cumulînd funcții esențiale, ca:

1) sinteza antigenelor de transplantare (moleculele din clasa I) cu funcțiile de „țintă" și de markeri biochimici ai identității și individualității genetice, cu rol în apărarea antivirală și antitumorală;

2) funcția de declanșare a reacțiilor imunitare, bazate pe interacțiuni și cooperări celulare, mediată de moleculele din clasa II CMH;

3) sinteza unor constituenți esențiali ai sistemului complement, cu rol în distrugerea litică a celulelor-„țintă", marcate prin combinarea lor prealabilă cu anticorpii specifici (molecula din clasa III CMH).

Întrucît indivizii neînrudiți genetic exprimă totdeauna seturi diferite de gene CMH, antigenele codificate de ele reprezintă, alături de Ig și de receptorii celulelor T, a treia clasă de proteine cu rol în recunoașterea imunitară.

Polimorfismul extrem al produșilor CMH reduce enorm șansa ca un agent patogen să mimeze în structura sa antigenică produșii CMH, respectiv să le semene aproape pînă la identitate. Datorită toleranței organismului față de propriii produși self CMH, acest fenomen, extrem de rar, de mimare moleculară ar putea furniza un mecanism eficient prin care anumiți agenți patogeni ar scăpa de reacțiile răspunsului imun.

Evoluția complexului major de histocompatibilitate

Capacitatea de a respinge grefele apare la nevertebrate (anelide și echinoderme).

Rîmele și steaua de mare au un „sistem imunitar" cu mai multe caracteristici proprii sistemului de recunoaștere, reprezentat la mamifere de celulele T. Lipsite de CMH, de timus, de limfocite și de Ig-anticorp, ele au un sistem precursor celui de la chordate prin care recunosc moleculele alogenice. Ceva mai mult, celulele circulante au specificitate și memorie de histocompatibilitate. Datorită acestor particularități, rîmele resping grefele de tegument provenite de la organisme recoltate din alte regiuni geografice. Fenomenul de respingere evoluează în două faze: 1) faza acelulară, constînd din blocarea inhibitorilor enzimelor lizosomale și 2) faza celulară, caracterizată prin infiltrarea coelomocitelor în țesutul grefat. Cea de-a doua grefă este respinsă mai rapid, ceea ce demonstrează existența „memoriei imunologice". „Memoria" poate fi transmisă la alte rîme prin intermediul coelomocitelor, ca în imunitatea adoptivă de la mamifere.

În mod asemănător, coloniile de anemone de mare (*Anthopleura elegantissima*) răspund prin eliberarea de nematociști la contactul cu alte colonii ale aceleiași specii, pentru a răni coloniile invadatoare. În schimb, țesuturile singenice și obiectele neanimate sînt tolerate perfect (Lubbock, 1980).

Toate chordatele au capacitate de respingere a grefelor de țesuturi și organe, ceea ce implică existența unui sistem imunitar funcțional. Astfel, respingerea acută a grefelor a fost observată experimental la peștii osoși (*Teleosteeni*) și la amfibienii anuri (broască). Reptilele, peștii cartilaginoși, ciclostomii (*Petromyzon marinus*), urodelele (*Salamandra*) și amfibienii apozi au capacitatea de respingere a grefelor de tip cronic. În sfîrșit, toate speciile de păsări și de mamifere testate resping acut grefele de piele, cînd provin de la indivizi diferiți (fig. 269).

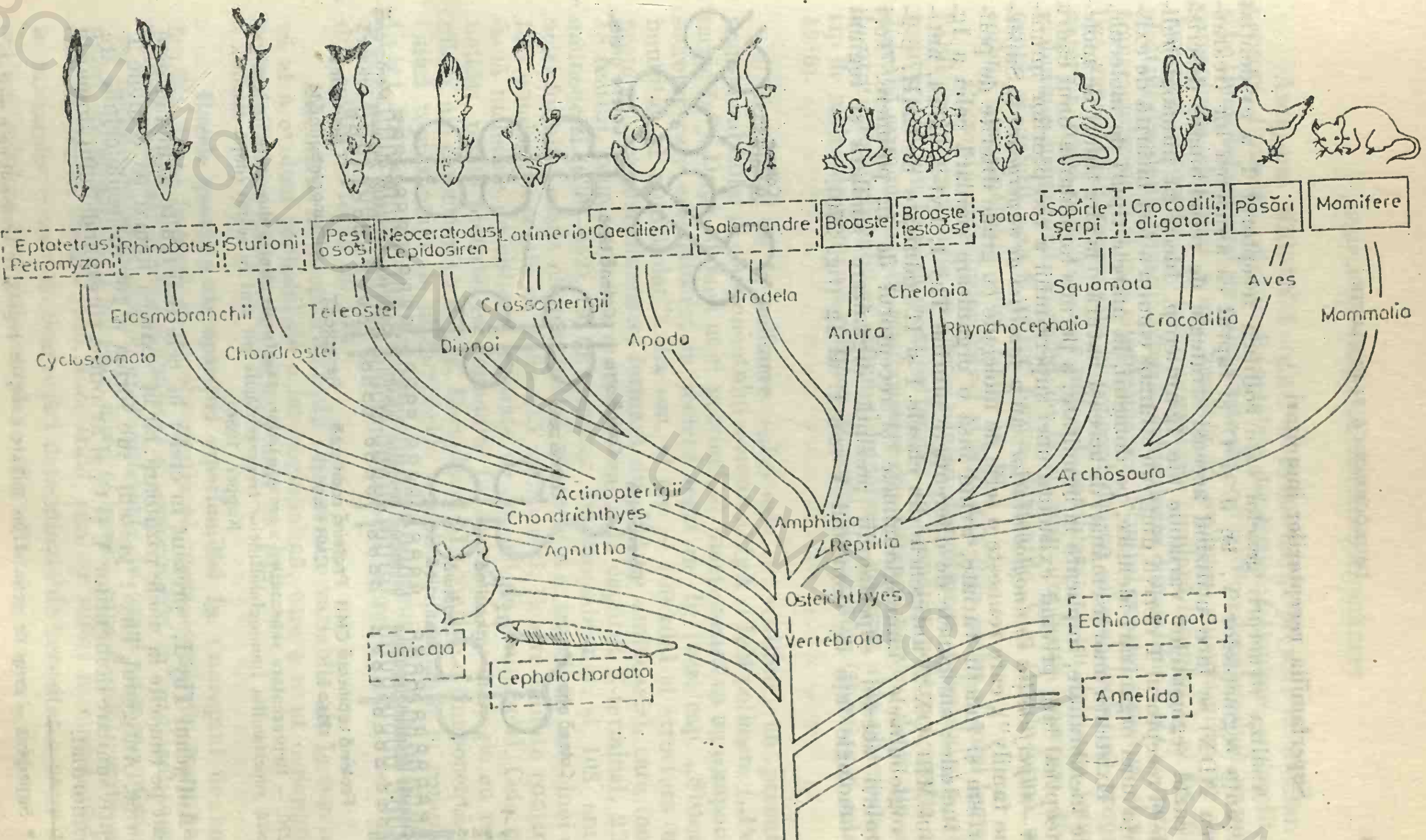


Fig. 269. — Apariţia complexului major de histocompatibilitate la Chordate. Denumirile încadrate într-un dreptunghi indică prezenţa CMH cel puţin la unele specii dintr-o clasă; dreptunghi punctat — absenţa CMH la toate speciile. Absenţa unui cadru indică lipsa datelor (după Klein, 1977).

Superfamilia receptorilor imunitari

Analiza structurii genelor care codifică receptorul T a evidenţiat prezenţa segmentelor V, D, J şi C, şi faptul că asocierea lor (rearanjarea ADN) se face utilizînd aceeaşi strategie de recombinare descrisă în cazul segmentelor variabile ale Ig-anticorp. Ideea că imunoglobulinele şi receptorul T derivă dintr-un strămoş comun a fost întărită de existenţa unei organizări identice, pe domenii, la ambele tipuri de molecule.

Existenţa unor asemănări de aceeaşi natură şi la alte tipuri de molecule membranare, implicate în imunitate, a permis formularea unui cadru conceptual larg privind existenţa unei superfamilii a receptorilor imunitari—*superfamilia imunoglobulinelor* sau a *familiei de supergene** („Supergene family"), care reuneşte o serie de molecule cu grade diferite de polimorfism şi funcţii variate, avînd însă o organizare similară celei a Ig. Ea include : antigenele de diferenţiere murine Thy-1, Lyt-2, L3T4, antigenul MRC-OX-2, antigenele din clasele I şi II codificate de CMH, β-2-microglobulinele, imunoglobulinele şi receptorul de Ig polimere. Toţi membrii acestei superfamilii prezintă organizare similară şi regiuni cu omologie faţă de domeniul V sau C al Ig (fig. 270).

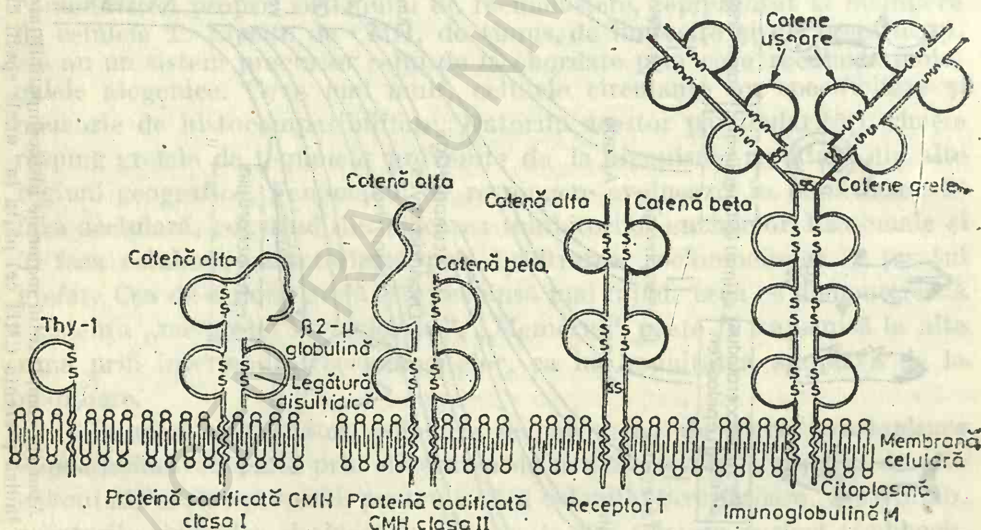


Fig. 270. — Reprezentare schematică a asemănărilor structurale dintre diferitele molecule ce formează superfamilia imunoglobulinelor (reprezentările nu sînt la scară) (după Marrack şi Kapper, 1986).

Antigenul Thy-1, prezent in creier la cele mai multe animale, este prezent pe timocite la unele rozătoare, iar la şoarece numai pe celulele T periferice. Antigenul Thy-1 prezent sub forma a 10^6 molecule/celulă are secvenţe similare domeniilor V şi C, şi ar putea corespunde unui domeniu Ig primordial.

* Supergenă = grup de gene strîns linkate care, de regulă, se transmit ca o unitate.

Antigenul MRC-OX-2 (g.m. ~ 45 000 dal), prezent la şobolan pe neuroni, timocite, celulele B, celulele dendritice foliculare, endotelii, ca şi pe timocitele umane, cu o densitate de ~ 3×10^4 molecule/celulă, ar putea corespunde stadiului prim, următor în evoluţia superfamiliei Ig de la domeniul primordial. El are o organizare similară lanţului L al Ig, fiind alcătuit din două domenii externe, echivalente domeniilor V şi C, o regiune transmembranară şi una citoplasmatică. Studiul acestei structuri şi analiza genei OX-2 umane este în concordanţă cu schema ipotetică propusă anterior, după care Thy-1 ar putea fi considerat ca un domeniu imunoglobulinic primordial. Pornind de la el, prin duplicare, oarecare divergenţă şi deleţii s-ar fi putut forma domeniile V şi C sub forma unei catene asemănătoare celei L de la Ig.

Prezenţa antigenelor Thy-1 şi MRC-OX-2 în creier şi rolul lor probabil în interacţiunile necesare pentru dezvoltarea creierului şi a altor ţesuturi permit ipoteza că superfamilia Ig a apărut pentru a media mai degrabă evenimentele de recunoaştere din sistemul nervos, decît din alte ţesuturi. Este probabil că sistemul imunitar a adoptat abia ulterior acest tip de molecule pentru a recunoaşte antigenele străine (Barclay şi colab., 1986).

Receptorul de Ig polimere (pIg) este, în realitate, un precursor transmembranar al componentului secretor al IgA şi IgM polimere („Polymeric Ig"). După clivarea unei porţiuni, el funcţionează ca un component secretor care este eliberat în secreţii legat de Ig (vezi cap. „Sistemul imunitar al mucoaselor"). La om, el are ~ 100 kdal şi structura unei proteine transmembranare, formată din 773 de aminoacizi, care includ 18 resturi, reprezentînd o secvenţă-semnal la capătul N-terminal, 22 de aminoacizi (630—652), ca un segment transmembranar, şi 103 aminoacizi formînd coada citoplasmatică. Segmentul extracelular are cinci unităţi omologe repetate de 110—115 aminoacizi, fiecare unitate conţinînd două molecule de cisteină separate de 50—60 de aminoacizi. Cele cinci unităţi, pliate probabil ca domeniile Ig, seamănă ca omologie cu regiunile V ale catenelor Vk ale Ig. Receptorul pIg conţine o componentă glucidică reprezentată de oligozaharide complexe, adăugate în complexul Golgi. Prin îndepărtarea enzimatică a unui segment de ~ 20 kdal, el este convertit la forma matură a componentului secretor, care este eliberat din celulă şi legat de pIg.

Asemănarea receptorului pIg cu regiunile variabile ale Ig sugerează că el a evoluat probabil de o imunoglobulină, care a avut o regiune V cu specificitate pentru un situs plasat pe pIg.

Bazele genetice ale apariţiei superfamiliei Ig. Conceptul de superfamilie Ig se bazează şi pe observaţia că mecanismele de rearanjare a genelor, utilizate pentru amplificarea conformaţiei în cazul anticorpilor, sînt regăsite ca atare sau cu unele diferenţe, în cazul altor receptori imunitari. Pe această bază s-a emis ideea că genele care codifică aceste molecule ar deriva dintr-o genă ancestrală, care ar suferi în cursul evoluţiei metazoarelor o serie de rearanjări determinate de necesitatea unor interacţiuni celulare tot mai complexe (fig. 271).

Faptul că secvența aminoacizilor într-un segment V izolat de la rechin este foarte asemănătoare celei de la șoarece (Litman și colab., 1985) demonstrează că aceste rearanjări au apărut foarte timpuriu în

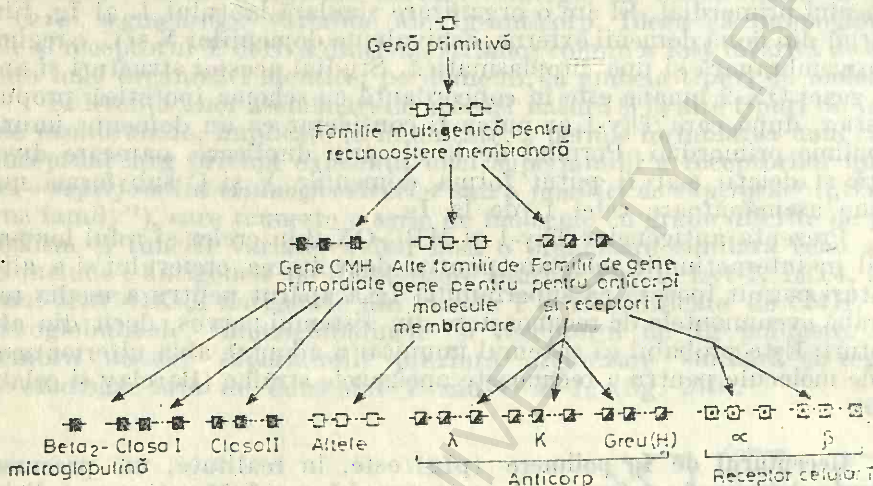


Fig. 271.— Reprezentare schematică a evoluției familiei de supergene, care codifică receptorii sistemului imunitar (după Hood și colab., 1984).

cursul evoluției vertebratelor. De asemenea, prezența la rechin a unor semnale de recombinare identice celor de la vertebratele superioare demonstrează că aceste mecanisme erau operaționale acum cîteva sute de milioane de ani. După Hood și colab. (1984), familiile de gene primordiale au funcționat ca unități de evoluție, care, prin duplicarea unei părți din structura lor sau a structurii, în ansamblu, au evoluat spre noi familii de gene cu funcții noi. Genele pentru anticorpi au apărut ca o ramificație a acestor familii. În acord cu acest concept, mecanismele de rearanjare a genelor, utilizate pentru a produce diversitatea enormă a Ig și a receptorilor T, sînt foarte asemănătoare celor care au acționat în cursul evoluției genomului. Aceasta demonstrează că sistemul imunitar reutilizează ingenios, în favoarea sa, mecanismele de variație și reorganizare a genomului, respectiv ale familiei de gene ancestrale, așa cum au funcționat în cursul evoluției lor multimilenare (Rougeon, 1985). Întrucît în cursul evoluției recunoașterea substanțelor *self* a precedat obligatoriu recunoașterea celor *nonself* este evident că sistemele moleculare necesare pentru depistarea acestora din urmă au avut o apariție mai tardivă.

Pe plan biologic general, este posibil ca strategia de amplificare a informației și diversității utilizate de sistemul de gene pentru anticorp a fost folosită, probabil, anterior și de alte sisteme, ca, de exemplu, receptorii olfactivi, receptorii pentru hormoni, moleculele implicate în interacțiunile neuronale etc.

Evoluția sistemului imunitar

(Pl. 31–33)

„Faptele, în biologie, nu au sens, decît în funcție de evoluție".

Th. Dobzhansky

Deși preocupările de imunologie comparată sînt relativ vechi și au făcut obiectul mai multor cercetări în ultimele decenii, acest domeniu înregistrează un decalaj important față de imunologia mamiferelor, în general, și cea a omului în special.

Unul din factorii determinanți ai acestei stări de fapt este reprezentat de diversitatea extrem de mare de organizare și de funcție a nevertebratelor și chiar a vertebratelor primitive. Ele sînt cunoscute, mai ales, sub raportul anatomiei lor și infinit mai puțin sub cel al biologiei, al constantelor biochimice, al sensibilității și al reacțiilor de apărare la infecții. Acest fapt împiedică stabilirea unor modele experimentale și a unor concluzii cu caracter de generalitate.

Un alt inconvenient decurge din faptul că studiile sînt limitate la un număr restrîns de specii, uneori nesemnificative sub raportul relațiilor lor filogenetice, selecționate pe criterii subiective (în funcție de interesul diferiților cercetători, de accesibilitate și de posibilitățile de obținere, de întreținere în acvarii și/sau vivarii, de ușurința manipulării etc.). Din aceste motive, integrarea datelor lacunare într-un cadru conceptual coerent este foarte dificilă sau chiar imposibil de realizat în etapa actuală.

O dificultate majoră decurge din faptul că mulți cercetători utilizează denumirile comune, vernaculare („snail" (melc), „oyster" (stridie), „tortoise" și „turtle" (broaște țestoase marine) etc.), în locul celor științifice, ceea ce împiedică confruntarea riguroasă și coroborarea rezultatelor. În plus, cele mai multe lucrări abordează doar aspecte particulare ale răspunsului imun (fie mecanisme umorale, fie fagocitoza, fie respingerea grefelor etc.), în așa fel încît reconstituirea particularităților integrale ale sistemului imunitar al unei clase sau unui ordin sistematic este foarte greu de realizat.

În etapa actuală există un acord, aproape general, că majoritatea datelor foarte vechi nu pot fi valorificate, datorită tehnicilor simpliste utilizate, rezultatelor formulate într-un cadru prea general și vag, dificultății de a le pune în acord cu conceptele atît de riguroase ale imunobiologiei contemporane. În același timp, există opinia că majoritatea datelor imunobiologiei moderne nu pot fi aplicate nevertebratelor și vertebratelor inferioare.

Primele cercetări asupra particularităților de evoluție ale infecției și imunității la nevertebrate au fost efectuate de Metchnikoff (1882), care

a descoperit cu această ocazie procesul de fagocitoză. Crustaceul de apă dulce, *Daphnia magna*, infectat cu sporii unui microorganism levuriform, *Metschnikowia* (*Monospora*) *bicuspidata*, ce pătrunde odată cu hrana, trecînd în cavitatea generală, se apără prin intermediul unor celule mobile (amibocite) care îi înglobează şi digeră. Cînd numărul sporilor este prea mare, cei care n-au fost distruşi germinează şi se multiplică, producînd moartea crustaceului.

Celule comparabile funcţional fagocitelor au fost descrise, la mai multe specii, de I. Cantacuzino, preocupat de imunitatea la nevertebrate o perioadă îndelungată (1897—1925) din activitatea sa.

Bazele imunologiei comparate au fost puse de Metchnikoff (1901), care a arătat că injectarea de toxină tetanică la aligatori induce formarea de antitoxină, şi de May (1923), care a demonstrat respingerea alogrefelor şi grefelor xenogenice de piele şi acceptarea autogrefelor la cameleon (*Anolis carolinensis*).

Conceptul de imunoevoluţie

După Cooper (1982), procesul de evoluţie imunitară prezintă trei nivele filogenetice majore (tabelul nr. 63):

1) *Recunoaşterea cvasi-imunitară* („Quasi-immune-recognition"), prezentă practic la toate animalele, este întîlnită ca mecanism exclusiv la nevertebratele primitive. Constă în capacitatea de a recunoaşte ţesuturile alogenice şi de a manifesta reacţii de incompatibilitate. Ca urmare, poate fi evidenţiată prin întîlniri alogenice sau xenogenice între celule şi ţesuturi. Celulele self sau autogene sînt recunoscute ca atare şi sînt acceptate definitiv. După criteriile utilizate la vertebrate, această formă de recunoaştere nu este tipic imunologică, deoarece nu conferă memorie specifică.

2) *Imunitatea primordială mediată celular* („Primordial cell-mediated immunity") corespunde răspunsului tipic al nevertebratelor evoluate (anelide, echinoderme, tunicieri). Are drept caracteristici mai deosebite specificitatea şi memoria imunologică. Este evidenţiată, de asemenea, prin reacţii de incompatibilitate la alogrefe şi xenogrefe.

3) *Imunitatea globală mediată celular şi umoral* („Integrated cell-mediated and humoral antibody immunity", engl. „integrated"=integral, complet, alcătuit din mai multe părţi, integrat) (fig. 272). Această formă corespunde unei diferenţieri cu complexitate crescîndă, apariţiei celulelor T active în respingerea grefelor în imunitatea mediată celulară, în general, şi celulelor B producătoare de anticorpi.

Fenomenele de recunoaştere la nevertebrate. Capacitatea de a recunoaşte diferenţele dintre self şi nonself este întîlnită în tot regnul animal, începînd chiar de la organismele unicelulare şi multicelulare simple. Ea reprezintă o proprietate fundamentală de la care a evoluat reactivitatea imună complexă a vertebratelor.

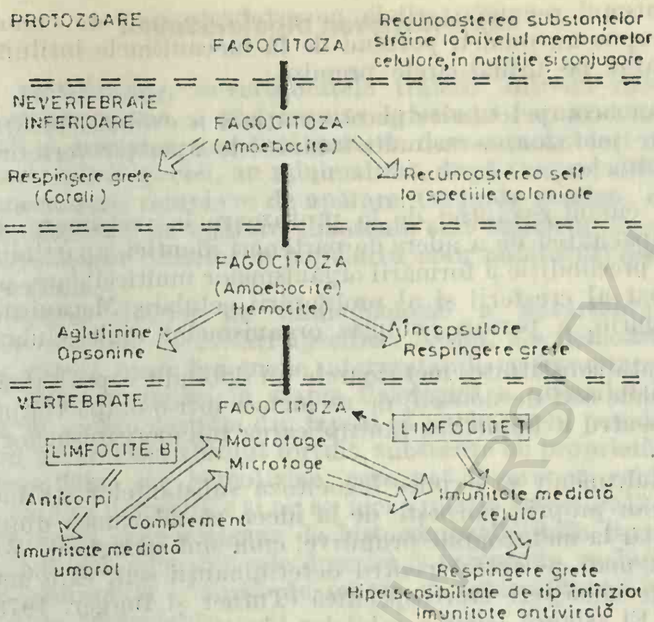


Fig. 272. — Evoluţia răspunsului imun. Principalele reacţii de apărare observate la cîteva grupuri majore de organisme animale.

Tabelul nr. 63

Nivelele filogenetice majore de evoluţie imunitară (după Cooper, 1982)

Tipul	Prezent	Filumurile sau clasele identificate	Dovezi experimentale
Cvasi-imuno-recunoaşterea	Nevertebrate şi vertebrate	Celenterate Tunicieri Mamifere	Incompatibilitate la alogrefă Incompatibilitate alogenică Reacţii limfocitare mixte
Imunitatea primordială mediată celular	Nevertebrate evoluate Vertebrate (?)	Anelide Echinoderme	Incompatibilitate la alogrefe, cu memorie specifică
Imunitatea mediată celular şi umoral	Toate vertebratele	Peşti Amfibieni Reptile Păsări Mamifere	Foarte numeroase şi diverse

Mecanismul recunoașterii la nevertebrate nu este cunoscut. Kolb (1977) a propus un model, pornind de la mecanismele întîlnite la metazoare și bazat pe următoarele premise:

1) Imunocompetența celulară esențială a evoluat, printre anumite nevertebrate metazoare, cu mult înainte de apariția vertebratelor și a imunoglobulinelor.

2) În cursul evoluției de la protozoare la metazoare, celulele au dobîndit capacitatea de a adera de parteneri identici, aparținînd aceleiași specii, ca o precondiție a formării organismelor multicelulare, prin controlul coordonat al creșterii și al proliferării celulare. Mecanismul, apărut foarte timpuriu, a permis evoluția organismelor multicelulare.

3) Odată constituite, metazoarele au dobîndit capacitatea de a deosebi moleculele self de nonself, de asemenea într-o etapă timpurie a evoluției lor, pentru a împiedica multiplicarea microorganismelor în țesuturile lor.

Modelul, menit să explice fagocitoza substanțelor străine și menajarea celulelor proprii, pornește de la ideea că adeziunea dintre celulele identice, chiar la metazoarele primitive, cum sînt spongierii, este mediată de prezența unor receptori pentru determinanții self, care acționează ca factori de recunoaștere stereospecifică (Turner și Burger, 1973; Wilkinson, 1976). Ei asigură legarea celulelor identice învecinate, prin interacțiunea dintre determinanții self și receptorii pentru self.

Un mecanism similar ar fi funcțional și în fagocitoză. Interacțiunea celulelor self cu fagocitele, prin acest mecanism, determină blocarea fagocitozei (fig. 273). Cînd contactul fagocit — celulă nu duce la recunoaștere specifică, fagocitoza nu este blocată și celulele străine (spre exemplu, bacteriile) sînt distruse.

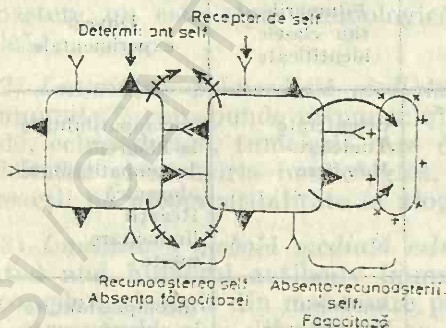


Fig. 273. — Recunoașterea indirectă a celulelor străine. Activitatea fagocitară a celulelor într-un țesut este blocată prin stabilirea contactelor stereospecifice. Particulele străine nu se „potrivesc" în receptorul pentru self și, ca urmare, sînt fagocitate (după Kolb, 1977).

Lipsa recunoașterii specifice self — nonself poate fi dată de absența determinanților corespunzători pe celulele străine, iar la organismele primitive și de unii factori (ca diferențele de sarcină electrică, tensiunea superficială sau alți parametri fizici care influențează contactul dintre suprafața celulelor străine și cele ale gazdei). În consecință, toate particulele care nu se pot potrivi în receptorii de self sînt respinse ca străine.

Imunobiologia nevertebratelor

Ca şi vertebratele, nevertebratele trăiesc într-un mediu foarte bogat în microorganisme şi sînt expuse agresiunii lor. Durata redusă a unei generaţii şi, mai ales, numărul mare de descendenţi, deşi insuficiente pentru supravieţuirea speciei, au minimalizat, după Cooper (1982), necesitatea unor mecanisme complexe de apărare. Cu toate acestea, deşi uneori rudimentare, sistemele de apărare cunoscute sînt suficient de eficiente şi explică reuşita nevertebratelor în popularea unor habitaturi foarte bogate în microorganisme.

Interpretarea datelor de imunobiologie a nevertebratelor este îngreuiată de anumite dificultăţi specifice. Astfel, s-a demonstrat că, în foarte multe cazuri, unele fenomene interpretabile ca imunitare, exprimă, în realitate, doar schimbări în starea fiziologică a animalelor studiate. O altă sursă de eroare decurge din faptul că unele specii posedă în hemolimfă, în mod natural sau absolut fortuit, substanţe cu proprietăţi de aglutinine, bacteriolizine sau hemolizine, care pot fi eronat echivalate cu anticorpii, deşi sînt nespecifice şi nu au nici o relaţie structurală cu aceştia. În sfîrşit, prezenţa unor antigene de histocompatibilitate invariante sau foarte asemănătoare, cum sînt cele descrise la nematode, moluşte şi artropode, poate reprezenta o sursă de eroare în interpretarea rezultatelor experienţelor de transplant.

Mecanismele majore ale imunităţii la nevertebrate sînt nespecifice, fiind reprezentate, în special, de fagocitoză şi de încapsulare, care constă în formarea unei membrane delimitante, în jurul particulelor străine de către celulele amoebiforme.

Celulele implicate în apărarea nevertebratelor

Cunoştinţele referitoare la celulele „imunocompetente" ale nevertebratelor sînt fragmentare şi puţin numeroase.

Sub denumirea globală de imunocite au fost descrise o varietate de celule cu funcţii de apărare, considerate de mulţi cercetători drept precursori ai limfocitelor T şi B de la mamifere (Cooper, 1982; Roitt şi colab., 1985). Ele sînt întîlnite iniţial la acelomate (spongieri şi celenterate) sub formă de amoebocite, care reprezintă prima formă de celule protectoare primitive.

Pornind de la ele, au fost descrise două căi distincte de evoluţie. Prima corespunde celomocitelor şi hemocitelor de la anelide, moluşte şi artropode, iar cea de-a doua, complet separată, celulelor limfoide primitive de la tunicieri şi echinoderme. Acestea sînt, foarte probabil, precursorii celulelor T şi B de la vertebrate.

O serie de date experimentale sugerează participarea celor trei tipuri de celule în reacţiile de apărare ale organismelor purtătoare. Deşi asupra acestui mod de evoluţie există un acord cvasiunanim, au fost semnalate o serie de aspecte particulare, caracteristice anumitor grupe de organisme.

La *lumbricide*, cei mai mulţi autori atribuie un rol major în apărare celomocitelor, care au o morfologie similară limfocitelor şi sînt capabile să răspundă proliferativ la stimularea cu antigene şi mitogeni. La aceste

organisme, cavitatea celomică este plină cu un lichid, ce conţine o cantitate mică de proteine (6 g/l), în care analiza electroforetică a evidenţiat şase componente, a căror semnificaţie nu este cunoscută. Chateaureynaud-Duprat şi Izoard (1977) au descris prezenţa în lichidul celomic a două tipuri de celule:

1) *Tipul leucocitar*, reprezentat de celule cu un raport nucleocitoplasmatic ridicat şi cu o activitate mitotică remarcabilă, este mai frecvent la *Lumbricus terrestris* (rîma de pămînt) decît la *Eisenia*. Ele au o activitate complexă, corelată cu stadiul de diferenţiere, realizînd un răspuns protector specific, care implică aglutinarea de contact, răspunsul mediat celular, iar în cazul celulelor mature, capacitatea de a secreta şi excreta substanţe cu rol asemănător anticorpilor.

2) *Chloragocitele* („Chloragocytic cells"), mai frecvente la *Eisenia fetida* decît la *Lumbricus*, sînt celule cu funcţii normale, asemănătoare ficatului de la vertebrate. Ele conferă rîmelor un mecanism de apărare umoral foarte puternic, relativ nespecific, probabil de natură enzimatică, asigurat de chloragocite.

După Chateaureynaud-Duprat şi Izoard (1977), particularităţile celor două tipuri de mecanisme imunitare ar fi corelate cu mediile naturale în care trăiesc organismele respective: *Lumbricus terrestris*, răspîndit în sol, respectiv într-un biotop care, în mod normal, nu este foarte populat de agenţi potenţial patogeni, a dezvoltat un mecanism de apărare relativ specific, bazat exclusiv pe celule de tip leucocitar, care asigură atît mecanismele de tip umoral, cît şi pe cele de tip celular. În schimb, la *Eisenia*, care trăieşte în gunoiul de grajd, a evoluat un mecanism umoral puternic cu caracter enzimatic, însă nu foarte specific.

La *echinoderme* au fost evidenţiate, în experienţe de respingere a alogrefelor, o serie de celule asemănătoare leucocitelor, descrise sub denumirile de macrofage, eozinofile şi hemocite („Lymphocyte-like cells").

Tunicierii prezintă în sînge imunocite asemănătoare morfologic şi funcţional cu limfocitele vertebratelor. Ele sînt capabile să producă rozete cu hematiile de oaie, să prolifereze în culturile de limfocite mixte alogenice şi în prezenţa mitogenilor limfocitari.

Celulele protectoare ale nevertebratelor nu au receptori de suprafaţă. Rolul acestora ar fi preluat de aglutininele normale, care ar putea îndeplini funcţia de unităţi de recunoaştere sau de pseudoreceptori ai imunocitelor. Nu au fost evidenţiate celule capabile să sintetizeze şi să secrete anticorpi specifici.

Nevertebratele, în general, nu par să răspundă la o gamă largă de antigene, fapt care explică şansele reduse de dezvoltare a fenomenelor de recunoaştere specifică şi a memoriei imunologice.

Tendinţa imunocitelor de a forma agregate celulare specializate este evidentă încă de la protostomi (moluşte, anelide, artropode), sub forma glandelor hemale de la rîme, a splinelor branhiale de la anumite moluşte, a ţesuturilor hematopoetice la anumite artropode. La nevertebratele deuterostome, echinoderme şi tunicieri, imunocitele sînt agregate în centrii hematopoetici de tipul organului axial de la echinoderme sau al nodulilor limfocitari asociaţi cu branhiile de la tunicieri.

„Imunitatea" umorală la nevertebrate

Experimental s-a demonstrat, în cazul mai multor specii, că acoperirea substanţelor sau a celulelor străine cu anumiţi factori umorali, prezenţi la animalele sănătoase (aglutinine, bactericidine etc.), stimulează procesul de fagocitoză. Acest tip de substanţe ce mimează acţiunea opsoninelor sînt numite *antisome*. Existenţa unor mecanisme umorale este frecvent semnalată la nevertebrate. Ele nu sînt însă niciodată determinate de molecule de tip imunoglobulinic ca la vertebrate.

Imunobiologia moluştelor

Este puţin cunoscută, deşi prezintă un interes deosebit, datorită capacităţii lor de a acţiona ca gazde intermediare pentru unii agenţi patogeni pentru om. Astfel, gasteropodul *Australorbis glabratus*, gazdă intermediară pentru *Schistosoma mansoni*, secretă, după aproximativ 9 zile de la infectare, un factor imobilizant al agentului patogen. Rezistent la inactivare la 56°C, acest factor are acţiune nespecifică, deoarece imobilizează şi alte microorganisme.

Hardy, Fletcher şi Olafsen (1977) au demonstrat existenţa fenomenelor de imunitate antibacteriană la stridiile *Cressostrea virginica* şi *C. gigas*, fără a stabili contribuţia relativă a factorilor celulari şi a factorilor efectori umorali de tipul aglutininelor sau lizozimului. În general, infecţiile bacteriene sînt urmate de o creştere a capacităţii fagocitare a hemocitelor, asociată cu o creştere a titrului aglutininelor, ceea ce pledează pentru existenţa posibilă a unei activităţi opsonizante. Imposibilitatea de a creşte titrul aglutinant al lichidului celomic la stridii, după injectarea cu hematii de mamifere, ca antigen, sugerează că aceste organisme nu produc răspuns imun decît faţă de molecule sau celule pe care le întîlnesc în mod natural.

Baynes şi colab. (1977) au evidenţiat la melcii aparţinînd speciei *Biomphalaria glabrata*, infectaţi cu *Schistosoma mansoni*, prezenţa unor *„minicite"* implicate în apărare. Ele sînt cultivabile *in vitro* şi pot ataca sporochiştii de *S. mansoni* prin inserţia unei prelungiri citoplasmatice, ca un deget, pe suprafaţa tegumentului lor. Moartea parazitului se produce după ~ 4 ore de la contact, printr-un mecanism necunoscut.

În mod asemănător, *Sipunculus nudus*, un nevertebrat marin, inoculat intracelomic cu un ciliat parazit, *Anophris magii*, sintetizează după ~ 5—7 zile un factor litic, prezent în concentraţii semnificative şi la animalele infectate natural. Efectul litic se manifestă după ~ 15 minute de contact şi determină dezintegrarea totală a agentului patogen. Infecţiile repetate nu măresc concentraţia factorului litic şi nici activitatea lui, ceea ce demonstrează absenţa fenomenelor de memorie imunitară.

Crustaceul *Cambarus virilis* (racul de apă dulce din America de Nord) are capacitatea de a recunoaşte şi de a elimina din circulaţie proteinele serice heterologe, ca, de exemplu, albumina serică umană, dar nu prezintă reacţii imunitare de tip specific. În consecinţă, injecţiile repetate cu acelaşi antigen nu determină o eliminare accelerată.

Răspunsul imun este condiţionat de natura antigenului. Astfel, fagul ΦX 174, recunoscut ca foarte bun antigen la unele mamifere, deşi

are o structură mai complexă (ADN + proteine) şi o g.m. mai mare decît proteinele serice, nu induce un răspuns imun.

Capacitatea discriminării self—nonself a fost demonstrată experimental şi la crustaceul înrudit, *Procambarus clarkii*, comparînd consecinţele injectării hemocianinei proprii şi a unor proteine heterologe (albumina serică bovină şi gamaglobulina umană). Proteinele self difuzează rapid în organism, ajung la echilibru în ~10 minute, fiind regăsite integral la controlul efectuat după 24 de ore. În schimb, proteinele străine sînt eliminate după două ore, în proporţie de 80%. Experienţele demonstrează prezenţa a cel puţin trei tipuri de molecule de recunoaştere pentru proteina self şi pentru proteinele serice nonself.

Limulus polyphemus, un alt nevertebrat marin, întîlnit pe coasta Americii de Nord („Horseshoe crab"), are în hemolimfă aglutinine ce pot fi evidenţiate prin microscopie electronică. Ele au forma unor structuri inelare, cu Ø de 100 Å. Fiecare particulă prezintă un corpuscul central bine definit, cu Ø de 20—40 Å, care determină aspectul inelar. Examinarea cu puteri de mărire superioare sugerează că aglutininele ar avea, în acest caz, o formă aproximativ hexagonală.

Dintre lepidoptere a fost studiată în special *Galleria mellonella* („Moth wax"); la care s-a demonstrat posibilitatea inducerii unei stări specifice de protecţie, după injectarea endotoxinei produsă de *Pseudomonas aeruginosa*. Un efect similar a fost obţinut cu ajutorul unui vaccin inactivat. Concentraţia bacteriocidinelor specifice în hemolimfă evoluează în paralel cu puterea protectoare (fig. 274).

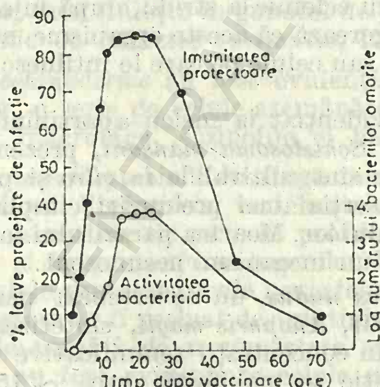


Fig. 274. — Dezvoltarea paralelă a activităţii bactericide şi a imunităţii protectoare faţă de *Pseudomonas aeruginosa* la larvele de *Galleria mellonella*, imunizate activ (vaccinarea larvelor s-a făcut la timpul 0) (după Cooper, 1982).

La dictioptere s-a demonstrat că masculii de *Periplaneta americana* (specie înrudită cu gîndacul de bucătărie, *Periplaneta orientalis*), imunizaţi cu ciliatul *Tetrahymena pyriformis*, produc în hemolimfă substanţe capabile să imobilizeze parazitul.

Respingerea grefelor la nevertebrate

Imunologia clasică a considerat că sistemele imunitare capabile de recunoaştere a substanţelor nonself şi de răspuns selectiv inductibil sînt limitate la vertebrate. În ultimele decenii s-au acumulat numeroase dovezi

experimentale, care demonstrează că recunoaşterea celulelor alogenice are o lungă istorie evolutivă şi a apărut, pentru scopuri diferite de apărare, încă de la unicelulare.

Reacţiile de recunoaştere au fost evidenţiate la *Amoeba*, *Paramoecium* şi *Stentor*, la care s-a demonstrat că schimbul de nuclei între două celule (echivalent unui transplant) are un rezultat diferit, în funcţie de gradul de compatibilitate: dacă nucleii sînt reimplantaţi într-o celulă foarte înrudită cu cea donatoare, receptorul supravieţuieşte. Dacă nucleii provin dintr-o sursă îndepărtată genetic, celula-gazdă moare. După Tartar (1970), capacitatea de recunoaştere specifică, evidentă la nivelul unicelularelor, ar anticipa fenomenele de compatibilitate tisulară, care la om limitează acceptarea grefelor de ţesuturi şi organe între indivizi diferiţi.

Incompatibilitatea de ţesut interspecifică a fost pusă în evidenţă de Spiegel (1955) şi de van der Vyver (1977), prin reacţii de reagregare a celulelor din spongieri. Experienţa s-a bazat pe posibilitatea disocierii celulelor componente ale acestora, cu păstrarea viabilităţii, şi pe capacitatea lor de a se reagrega, reconstituind organismul iniţial. Ei au demonstrat că amestecînd celule provenite de la doi spongieri diferiţi, agregatele celulare formate în suspensia celulară mixtă sînt alcătuite numai din celule de un singur tip, aparţinînd aceleiaşi specii. Nu s-au evidenţiat fenomene similare celor de respingere a grefelor sau de recunoaştere urmată de fagocitoză. Reagregarea celulelor se face sau nu, după cum este vorba de aceeaşi specie sau de specii diferite.

Primul grup de metazoare la care se observă fenomene autentice de respingere a grefelor sînt celenteratele. Primele cercetări devenite clasice au fost efectuate pe gorgone (*Eunicella stricta*, *Lophogorgia sarmentosa*), celenterate marine extrem de primitive, alcătuite numai din ectoderm şi endoderm. Théodor (1969) a demonstrat existenţa unei toleranţe perfecte între ramurile provenite de la acelaşi individ, urmată de „prinderea" grefei, dacă sînt suprapuse unele peste altele. Dacă se depune un mic fragment de la specia A (roşie) în contact cu ţesutul unei gorgone din specia B (albă), după 24 de ore, ţesutul fragmentului roşu este complet distrus, cu fenomene de liză celulară şi fragmentare masivă a ţesutului-ţintă. În acest proces, gorgona albă este „ucigaşă", iar cea roşie, ţinta ei. Utilizînd inhibitori ai transcrierii (actinomicina) şi ai traducerii informaţiei genetice (puromicina), Théodor (1980) a demonstrat că, în mod paradoxal, aceştia acţionează pe ţesutul-ţintă şi nu pe cel „ucigaş". Aceasta demonstrează că îndepărtarea ţesutului străin este realizată printr-un proces activ de „sinucidere" a ţesutului-ţintă şi nu printr-un atac asupra lui. Dovada o constituie faptul că tratarea ţesutului-ţintă cu actinomicină îl face rezistent faţă de contactul cu fragmentul „ucigaş".

Fenomene de respingere au fost semnalate, de asemenea, la hidra de mare colonială (*Hydractina echinata*) de către Du Pasquier şi Urbain (1974), care au evidenţiat şi existenţa unor elemente de control genetic de histocompatibilitate, care ar putea fi precursorii grupului de gene HLA de la om.

Cele mai multe studii privind imunitatea la transplant au fost efectuate la corali, reproducînd, în fapt, un fenomen natural foarte frecvent observat în recifurile coraliere din regiunile tropicale. Hildemann şi colab.

(1972), lucrînd cu coralul *Montipora verrucosa*, au demonstrat posibilitatea fuzionării şi menţinerii permanente a grefelor de ţesuturi singenice după „vindecarea" produsă în 4—6 zile de la transplant. În schimb, grefele alogenice, realizate între exemplare provenite din regiuni îndepărtate ale lumii, deci derivate din surse genetice diferite, sînt urmate de fenomenul de respingere. Reacţia este specifică, deoarece repetarea grefei este urmată de o respingere accelerată (răspuns de tip secundar), sugerînd existenţa memoriei imunologice, fapt neaşteptat, deoarece coralii nu au imunocite.

Rezultate similare s-au obţinut în cazul grefelor interspecifice între coralul *Acropora*, care se dezvoltă în jurul unor insule australiene, şi *Montipora*, prezentă în Hawaii. Ramurile coralului *Acropora* pot fi menţinute în contact intim cu ţesuturile noi ale receptorului. Iniţial, se observă vindecarea alogrefelor intercoloniale, urmată, după o perioadă de timp, de distrugere la zona de contact şi frecvent de moarte.

Hildemann, Johnson şi Jokiel (1978) au studiat fenomenele de compatibilitate la *Callyspongia diffusa*, care creşte în regiunile Hawaii şi indospecifice tropicale, sub forma unor colonii, cu prelungiri lungi, ca nişte degete, ce pornesc de la o bază legată de rocile coralifere. Ţesuturile moi au o pigmentare purpurie şi sînt dispuse pe un cadru scheletal, format din fibre fine, tari, de culoare brună, rezistente la degradarea în apa de mare. În natură se observă frecvent în cazul coloniilor foarte apropiate, apariţia unor conexiuni rezultate din grefe spontane intracoloniale şi, uneori, chiar fuziuni spontane, temporare, intercoloniale sau alogenice. Efectuarea transplantelor în condiţii controlate de laborator a permis următoarele concluzii : 1) legarea fermă a parabionţilor intracoloniali (singenici) cu un fir de vinilin este urmată de fuzionare la toate interfeţele şi de persistenţa transplantului, bazată pe compatibilitate ; 2) parabionţii alogenici (intercoloniali) nu fuzionează. După 4—5 zile se observă necroza ţesuturilor moi aflate în contact, datorită interacţiunilor citotoxice. Acest fenomen este foarte evident după 7—9 zile, la 25°C ; 3) repetarea grefelor, după 15 zile de la respingerea primară, determină reacţii citotoxice accelerate ; 4) reacţiile de respingere variază ca intensitate de la slabe la foarte intense, în funcţie de natura combinărilor intercoloniale. Fuziunea izogrefelor, incompatibilitatea alogenică, respingerea tipică primară şi reacţiile accelerate secundare demonstrează existenţa unei imunităţi de transplant, cu capacităţi de discriminare netă şi cu un component de memorie.

După Hood şi colab. (1984), sistemul de recunoaştere self—nonself descris are patru particularităţi în comun cu cel al vertebratelor : 1) recunoaşterea este mediată de molecule specifice, prezente pe suprafaţa celulelor ; 2) identificarea celulelor „străine" declanşează mecanismele efectoare ale respingerii, care duc la moartea celulelor străine adiacente ; 3) sistemul de recunoaştere are un grad evident de polimorfism, deoarece indivizii dintr-o specie dată par să aibă markeri de recunoaştere distincţi ; 4) distrugerea aloimună şi memoria pe termen scurt ar putea reprezenta funcţii primitive, legate de menţinerea specificităţii coloniei sau echivalenţe ale celor caracteristice celulelor T.

La nevertebratele mai evoluate apar unele forme de imunitate primordială, mediată celular. Emergenţa acestui mecanism poate fi atribuită evoluţiei unei cavităţi „închise" a corpului şi sistemului circulator,

care reprezintă un avantaj evolutiv, pentru formarea unui sistem de imunosupraveghere. La aceste organisme apare o varietate de „leucocite" (celomocite şi hemocite) cu potenţial de celule efectoare, inclusiv celule similare limfocitelor.

La anelide, care au un sistem imunitar mai complex, fenomenele de respingere a alogrefelor şi xenogrefelor, determinate de mecanismul de imunitate primordială mediată celular, sînt caracterizate prin specificitate şi memorie, ceea ce le apropie de reacţiile similare de la vertebrate. Experimental, s-a demonstrat că *Lumbricus terrestris* şi *Eisenia fetida* resping grefele provenite de la organisme recoltate din regiuni geografice diferite, deşi numărul de diferenţe alogenice ce pot fi recunoscute este mai mic decît al celor existente într-o populaţie (fig. 275). *Eisenia* pare să aibă o mai mare diversitate alogenică, deoarece prezintă un procent mai mare de alorespingeri decît *Lumbricus*.

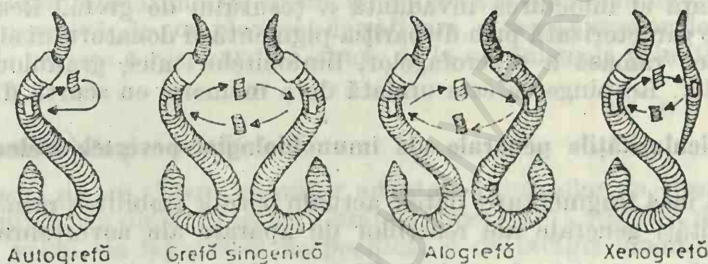


Fig. 275. — Reprezentare schematică a principalelor tipuri de grefe practicate experimental la rîme. Xenogrefele au fost practicate între *Lumbricus terrestris* şi *Eisenia fetida* (după Cooper, 1969).

În cazul xenotransplantelor interfamiliale, gradul de diferenţe antigenice dintre indivizi este reflectat de durata de supravieţuire a xenotransplantului; respingerea rapidă reflectă deosebiri mari între indivizi, în timp ce prezenţa mai multor antigene comune asigură o supravieţuire mai îndelungată.

Autogrefele se vindecă şi supravieţuiesc pe durata vieţii rîmelor, chiar dacă sînt plasate, spre exemplu, la *Lumbricus* în acelaşi „pat" cu o xenogrefă de la *Eisenia*. Această comportare reflectă specificitatea discriminării self — nonself.

Xenogrefele se vindecă totdeauna, dar, ulterior, sînt totdeauna distruse, cu o viteză corelată cu temperatura. La 15°C, xenogrefele primare dintre *Lumbricus* şi *Eisenia* sînt distruse, în medie, în 30 de zile (limitele individuale variază însă foarte mult, între 8 şi 147 de zile). Grefele secundare sînt respinse mai rapid, dar mecanismul memoriei nu este perfect cunoscut.

Unele date experimentale, care au demonstrat rolul celomocitelor în transferul adoptiv al imunităţii celulare, pledează în favoarea participării lor active în procesul de respingere a alo- şi xenogrefelor. Această funcţie a fost demonstrată prin transplantarea unui fragment de ţesut (xenogrefă) provenit de la *Eisenia*. După 5 zile, celomocitele, recoltate

într-o fază în care activitatea lor este maximă, au fost transferate la o gazdă secundară, *Lumbricus 2*. Dacă acestuia i se grefează o xenogrefă provenită de la donatorul iniţial *Eisenia*, respingerea este realizată rapid, la 15°C, deşi normal răspunsul caracteristic pentru *Lumbricus* este lent şi foarte slab. Accelerarea respingerii este datorată celomocitelor sensibilizate. Ea nu poate fi produsă cu lichidul celomic şi nici cu celomocitele normale sau stimulate cu soluţii saline. Studiul modificărilor morfologice a evidenţiat pătrunderea celomocitelor în matricea grefei, degradarea şi fagocitarea activă a fibrelor musculare, cu ajutorul enzimelor numeroase prezente în cele două tipuri de celomocite limfocitare şi granulocitare (Cooper, 1982).

Fenomene de respingere cronică a grefelor au fost evidenţiate şi la echinoderme, respectiv la *Cucumaria tricolor* (castravetele de mare) şi la *Protoaster nodosus*. Fenomenele apar iniţial sub forma unei hiperplazii superficiale de-a lungul zonei de contact dintre grefă şi receptor, cu distrugere celulară şi înlocuirea invadantă a ţesutului de grefă. Respingerea totală este caracterizată prin dispariţia pigmentării donatorului şi apariţia în matricea rămasă a macrofagelor, limfocitelor mici, granulocitelor şi eozinofilelor. Respingerea este urmată de o memorie cu scurtă durată.

Particularităţile generale ale imunobiologiei nevertebratelor

Deşi încă fragmentare, datele actuale permit stabilirea următoarelor particularităţi generale ale reacţiilor de apărare ale nevertebratelor:

1) Nevertebratele fac relativ frecvent infecţii naturale şi apărarea lor este în cea mai mare măsură nespecifică.

2) Principalele mecanisme efectoare sînt reprezentate de fagocitoză (digestia de către celulele amoeboide din sînge şi lichidele celomice) şi de încapsulare.

3) Clasificarea celulelor implicate în apărare nu poate fi făcută în termenii aplicaţi leucocitelor de la mamifere. Nu există probe că aşa-numitele „limfocite" de la nevertebrate au importanţa funcţională a celor de la vertebrate.

4) Natura receptorilor lor nu este cunoscută şi mecanismele de recunoaştere propuse sînt ipotetice.

5) Natura factorilor umorali cu putere protectoare nu este bine definită. Unele nevertebrate produc după imunizare cu anumite antigene substanţe asemănătoare anticorpilor, dar acestea nu au proprietăţi specifice.

6) Studiul chimic şi electroforetic al sîngelui, hemolimfei şi lichidului celomic nu a detectat prezenţa unor molecule cu particularităţile gamaglobulinelor. Singura excepţie semnalată este reprezentată de hemocianina gasteropodului *Megathura crenulata* („Key hole limpet") (Pollaro, Hakim şi Condie, 1965), folosită frecvent ca antigen în cercetările de imunologie.

După Cooper (1982), cele două proprietăți fundamentale ale răspunsului imun, specificitatea și memoria, ar apărea foarte curînd în cursul evoluției, la anumite grupe de celenterate. Argumentele sale au la bază respingerea de tip rapid a alogrefelor secundare și faptul că aceste organisme sînt la baza a două mari ramuri ale evoluției : a) cea care conduce la anelide, moluște și artropode (insecte și crustacee) și b) cea care duce la urocordate și vertebrate, via echinoderme. Or, anelidele și echinodermele au în mod cert memorie imunologică specifică. Nevertebratele nu prezintă reacții de hipersensibilitate încrucișată.

Imunobiologia vertebratelor

Deși studiile de imunobiologie a vertebratelor sînt, de asemenea, limitate la un număr mic de specii, ele reflectă aceeași tendință de diversificare progresivă, de complexare, de rafinare, a mecanismelor de recunoaștere și de reglare a răspunsului imun, de la organismele primitive pînă la mamifere.

Imunobiologia peștilor

Peștii au un sistem imunitar adecvat animalelor cu circulație sanguină simplă (nu dublă ca la vertebratele superioare), sprijinit de mecanisme mai vechi, ca fagocitoza nespecifică, și de factori umorali neimunoglobulinici. Răspunsul imun nespecific (înnăscut) apare anterior activării celui specific și include producerea de aglutinine, lizine, lizozim, complement etc. Mecanismele nespecifice sînt active în mucusul de pe suprafața corpului și/sau în sînge. Au fost, de asemenea, evidențiate celule citotoxice nespecifice și fagocite cu morfologie monocitară și granulocitară (Woo, 1987).

Agnathele (clasa *Cyclostomata*), cele mai primitive vertebrate, constituie, în același timp, prima clasă filogenetică ce prezintă ambele tipuri de imunitate, mediată umoral și celular, în absența unui țesut limfoid bine organizat. Astfel, ciclostomul marin *Eptatetrus stouti* („Hag fish") are doar mici focare hematopoetice în faringe, în lamina propria intestinală și în rinichiul anterior. Nu are plasmocite, însă limfocitele sale ce pot fi activate *in vitro* ca răspuns la antigene specifice și la mitogeni, conțin anticorpi, care pot fi evidențiați prin reacții de imunofluorescență. *Eptatetrus stouti* produce anticorpi ca răspuns la antigene solubile și celulare. Un alt ciclostom, *Petromyzon marinus* („Lamprey"), mai evoluat, are un timus primitiv, incomplet format, localizat între pungile faringeale 2 și 5. El conține focare de celule limfoide dezvoltate, cel puțin aparent, direct din celulele epiteliale. Măduva primitivă, localizată în arcul protovertebral, conține, de asemenea, celule limfoide care proliferează după stimularea antigenică. Adulții au cantități importante de proteine serice, între care două tipuri distincte, unele cu mobilitate electroforetică de tip γ și altele cu mobilitate de tip α și β. După injectare cu celule de *Brucella*, ca antigen, *P. marinus* produce anticorpi de tip 9S, formați, probabil,

numai din catene H, reprezentînd, se pare, cel mai primitiv tip de imunoglobuline.

Elasmobranhiatele primitive, ca, de exemplu, peștele „ghitară" (*Rhinobatus productus* „Guitar fish"), din categoria rechinilor plați, prezintă un răspuns imun mult mai intens decît cel observat la *Petromyzon*. Ele au timusul complet dezvoltat, ca un organ limfoid distinct, încapsulat, bine organizat și diferențiat, avînd o regiune corticală și una medulară cu corpusculi Hassal de tip primitiv. Splina devine în cîteva săptămîni un organ limfoid important, conținînd celule limfoide desprinse din jurul vaselor de sînge și avînd o organizare distinctă a pulpei albe și roșii. De asemenea, a fost semnalată prezența a numeroase focare de țesut limfoid în intestin, gonade, precum și în parenchimul renal. Elasmobranhiatele nu au plasmocite și nici precursori ai acestora. După imunizare cu fagul T2 sau cu hemocianina KHL („Key hole limpet"), produc anticorpi de tip 19S. Hemogrefele sînt inițial acceptate, pentru ca după 3 — 5 săptămîni să fie respinse printr-o reacție inflamatorie viguroasă, asociată cu infiltrate de celule mononucleare și necroză extensivă.

Dintre *peștii cartilaginoși* (*Chondrostei*) a fost în special studiat *Polyodon spatkula*, la care țesutul limfoid are o organizare mai evoluată. Timusul este bine dezvoltat și organizat cu lobi și lobuli, care conțin corpusculi Hassal și numeroase celule limfoide, în diferite stadii de diferențiere. Splina este bine dezvoltată, cu zone net delimitate de pulpă albă și roșie. A fost semnalată, de asemenea, prezența unor aglomerări dense de celule limfoide în peretele tubului digestiv. La condrostei a fost evidențiată constant prezența plasmocitelor și a precursorilor lor. Apariția lor reprezintă unul din elementele filogenetice cele mai tardive și ar avea loc, după unii cercetători, la elasmobranhiatele superioare. Plasmocitele sînt prezente în cantitate mare în pulpa albă splenică. Numărul lor crește semnificativ după stimularea cu un antigen și este asociat constant cu capacitatea mărită de a produce cantități mari de gamaglobuline.

La Teleostei, care posedă un sistem imunitar mult mai sofisticat, rolul principal revine splinei, a cărei ablație duce la absența producerii detectabile de anticorpi. Prezența celulelor producătoare de anticorpi a fost detectată nu numai în splină, ci și în rinichi și în sîngele periferic.

În ansamblu, imunobiologia peștilor seamănă cu cea a vertebratelor superioare, prin prezența Ig specifice și a celulelor citotoxice, și prin capacitatea de imunofagocitoză (leucocitele din sîngele periferic și celulele peritoneale fagocitează mai intens în prezența anticorpilor și a complementului). Se deosebește de acestea prin absența ganglionilor limfatici, numărul redus de Ig diferite și diferențele structurale ale anticorpilor. Distincția dintre funcțiile celulelor T și B nu este atît de netă ca la mamifere. Complementul poate fi activat atît pe calea clasică, cît și pe cea alternativă. Constituenții săi sînt foarte asemănători celor de la mamifere, iar liza necesită, de asemenea, prezența Ca^{2+} și Mg^{2+}.

Evoluția infecției și a imunității a fost studiată recent, la păstrăv, după injectarea unui parazit, *Cryptobia salmositica*. În faza acută, evoluția parazitemiei este controlată de anticorpii fixatori de complement. În cea cronică, rolul principal revine fagocitozei, prin intermediul macro-

fagelor peritoneale. Peștii vindecați de infecție rezistă la inocularea de probă. Transferul de limfocite de la animalele imunizate conferă protecție parțială. După cum s-a demonstrat, răspunsul imun poate fi diminuat de mulți factori (prezența metalelor grele, a antibioticelor, a unor bacterii asociate, precum și de dieta deficitară în proteine sau în acid pantotenic, de temperaturile scăzute și de infecțiile asociate cu protozoare).

Imunobiologia amfibienilor

Deplasarea vertebratelor de la mediul acvatic la viața terestră este asociată cu modificări profunde ale corpului, corelate cu restructurări celulare și funcționale ale sistemului imunitar. Modificările în viteza de circulație a sîngelui afectează distribuția antigenelor, a anticorpilor și a celulelor în sînge și au efecte profunde asupra organelor limfoide, care dobîndesc o arhitectură progresiv mai complexă. Ele duc treptat la formarea organelor limfoide specializate de la mamifere, la care ganglionii limfatici, cu structură complexă, intercalați în sistemul limfaticelor, furnizează cadrul unui răspuns imun regional, ce este, în același timp, controlat, fiind parte din sistemul imunitar global, integrat al organismului. Aceste modificări îngreuiează posibilitatea Ig cu greutate moleculară mare să ajungă în apropierea organismelor invadatoare.

La organismele mai avansate, la care sîngele circulă cu presiune mare, lichidul interstițial răspunde relativ lent la modificările conținutului sîngelui în anticorpi. Ca urmare, anticorpii cu g.m. mare tind să rămînă intravascular, exceptînd cazul în care permeabilitatea peretelui capilar este mărită în cursul proceselor inflamatorii.

De aceea, cei mai mulți cercetători consideră că asocierea importanței crescînde a Ig cu g.m. mică (mai ușor distribuite în compartimentele extravasculare) cu îmbunătățirile sistemului vascular nu este o simplă coincidență. La rîndul său, sistemul vascular perfecționat este corelat cu necesitățile metabolice noi impuse de viața terestră.

Numeroase observații au demonstrat că amfibienii fac spontan infecții produse de bacterii, microfungi, protozoare, infestări cu helminți, precum și tumori de origine virală. Foarte multe infecții au etiologii necunoscute, cu excepția tuberculozei și a bolii „redleg" produsă de *Aeromonas hydrophila*. Aceasta apare frecvent în coloniile de broaște din laboratoare. Agentul patogen poate fi izolat din sînge, cord, splină și mușchii picioarelor.

Amfibienii sînt în mod deosebit sensibili la atacul agenților patogeni încă din viața larvară timpurie, precum și în cursul metamorfozei (cînd mortalitatea este relativ mare, datorită suprasolicitării fagocitozei în acest proces) (tabelul nr. 64).

În viața larvară liberă însă, răspunsul imun mediat umoral și cel mediat celular au gradul de intensitate și de complexitate caracteristice organismelor adulte, deoarece larvele libere sînt expuse foarte timpuriu la infecția cu diferiți agenți patogeni. O dovadă o reprezintă și faptul că larvele de anure resping grefele de piele, produc anticorpi de tipul 19 S și 7 S și au celule care răspund la agenți mitogeni.

Tabelul nr. 64

Ontogenia răspunsului imun la amfibienele anure

La ecloziune	Stadiile de larvă liberă	Metamorfoză	Adulţi
Numai imunitate naturală	— Maturarea timusului — Maturarea splinei — Răspuns imun specific în anticorpi — Răspuns imun mediat celular	Depresia răspunsului imun specific	Restabilirea răspunsului imun complex

Metamorfoza este însoţită de modificări profunde biochimice, morfologice şi imunitare. Splina şi timusul pierd 30 — 40% şi respectiv 80 — — 90% din limfocite.

La *Rana catesbiana* (broasca verde americană), răspunsul în anticorpi în cursul metamorfozei este foarte mult diminuat în raport cu cel din stadiul de larvă liberă şi de adult. După Manning (1979), rolul acestei depresii a răspunsului imun ar permite stabilirea unor noi antigene self (de histocompatibilitate), caracteristice adulţilor, întrucît, în această fază, anurele ar avea o perioadă privilegiată pentru inducţia toleranţei, atît faţă de antigenele majore de histocompatibilitate, cît şi faţă de cele minore. În cursul ei, capacitatea de a respinge grefele este mult diminuată, probabil datorită diminuării numărului limfocitelor din timus.

Imunobiologia amfibienilor, studiată numai pe un număr relativ mic de specii, prezintă aspecte deosebit de interesante. Deşi condiţiile din acvarii şi vivarii sînt deosebite de cele din natură, amfibienii, ca grup, prezintă o serie de avantaje pentru studiul reacţiilor imunitare: 1) pot fi menţinuţi mult timp în condiţii controlate, permiţînd analiza răspunsului imun şi a fenomenelor de memorie; 2) pot fi supuşi timectomiei şi cercetării în condiţii de parabioză încă din stadiile timpurii; 3) permit utilizarea unor linii genetice de animale izogene.

Caracterele de grup evolutiv de tranziţie al amfibienilor sînt reflectate şi în structura sistemului imunitar, care prezintă diferenţe notabile între unele categorii de organisme.

Urodelele păstrează multe aspecte asemănătoare peştilor, în timp ce anurele dobîndesc cel puţin o dezvoltare incipientă a unor particularităţi caracteristice vertebratelor superioare.

La urodele, organele limfoide majore sînt timusul şi splina. La salamandra gigantă japoneză, un rol esenţial în limfogeneză ar reveni aglomerărilor limfoide din regiunea meningeală. Ca şi la alte vertebrate inferioare, splina este lipsită de organizarea complexă, atît de caracteristică de la mamifere (Cowden şi Dyer, 1971). Rolul diferitelor aglomerări limfocitare

în imunitate a fost demonstrat prin experienţe de iradiere, urmate de reconstituirea sistemului limfoid, şi prin transplante singenice. La unele specii apar acumulări limfoide în rinichi şi în lamina propria intestinală. Henry şi Charlemagne (1977) au semnalat prezenţa celulelor din seria plasmocitară, asociate cu granulocite în ţesutul perihepatic.

Urodelele nu au gnglioni limfatici tipici, nu au sistemul GALT şi nici măduvă limfopoetică. Sursa de limfocite B nu este cunoscută. După Haimovich şi Du Pasquier (1973), cel puţin în stadiile larvare, limfocitele ar putea fi multipotente. După alţi cercetători, ele ar putea deriva din timus. Urodelele au numai anticorpi de tip IgM. În general deci, imunologia lor este, din multe puncte de vedere, mai apropiată de strămoşii lor, asemănători peştilor şi are un caracter mai primitiv decît cel al organismelor din ordinul mai evoluat *Anura*.

Anurele, studiate mai mult decît urodelele, prezintă progrese mari de ordin morfologic, evidente şi sub raportul modificărilor sistemului limfoid.

Ca şi la peşti, rinichiul anurelor este un organ limfoid important. Ele sînt însă primele vertebrate la care apare sistemul GALT (Goldstine, 1975). La anurele ranide şi la butide apar ganglionii limfatici primitivi (mici, puţin dezvoltaţi ; uneori pot fi absenţi), sub forma corpilor jugulari, care reprezintă un nivel superior de organizare a sistemului limfoid.

Organul limfoid secundar cel mai important şi cel mai bine dezvoltat este splina. Răspunsul imun nu poate fi indus la anurele splenectomizate. Studiul structurii ei la broasca cu gheare (*Xenopus laevis*) a evidenţiat o organizare arhitecturală complexă, ca la homeoterme, respectiv : 1) o delimitare netă între pulpa albă şi pulpa roşie ; 2) aceeaşi anatomie a arterelor care intră în splină şi a arteriolelor terminale din zona marginală ; 3) existenţa unor celule dendritice, amintind pe cele descrise la mamifere, în zonele în care este capturat antigenul ; 4) existenţa unor zone net delimitate pentru limfocitele T şi B ; 5) lipsa centrilor germinativi. La *Rana catesbiana*, *Bufo marinus* şi *Xenopus laevis* splina, rinichiul anterior şi corpii jugulari prezintă modificări celulare importante ca răspuns la stimularea antigenică.

Apariţia măduvei oaselor. La poikiloterme, funcţia mielopoetică este asigurată de rinichi, ficat şi splină. Locomoţia terestră a impus o serie de modificări scheletale, ce au dus la apariţia oaselor „goale", asigurînd apariţia unui nou mediu pentru hematopoeză, reprezentat de măduva oaselor, care devine sursa de celule imunocompetente. Şi sub acest raport, amfibienii ocupă o poziţie intermediară. Urodelele, cu excepţia unor specii de salamandre fără plămîni (*Plethodonthridae*), nu au măduva oaselor. Aceasta este însă prezentă la anure, ca sursă importantă de celule-stem hematopoetice şi de ţesut limfoid.

Anticorpogeneza. Sursa de celule B nu este cunoscută. Este posibil ca acestea să derive tot din timus, ca şi celulele T, deoarece la larvele de *X. laevis*, limfocitele timice poartă pe suprafaţă molecule de Ig. Acestea pot fi „bonetate", endocitate şi resintetizate de celulele respective.

Ceva mai mult, la *X. laevis*, timectomia afectează atît imunitatea celulară, cît şi capacitatea de anticorpogeneză.

Anurele răspund la o gamă largă de antigene, care includ virusuri, bacterii, hematii, proteine serice heterologe etc.

După Marchalonis (1971), producerea anticorpilor la anure seamănă cu cea de la mamifere, atît în tipul de anticorpi produşi, cît şi în aspectele celulare generale. *Bufo marinus* (broasca rîioasă de mare), specie tropicală care poate fi menţinută uşor la 37°C, prezintă un răspuns viguros la antigenele flagelare de *Salmonella adelaide* şi la proteinele serice provenite de la mamifere. Numărul celulelor formatoare de anticorpi din splină devine semnificativ după 3 zile de la injectarea antigenului şi ajunge în platou după 7 zile. Apariţia anticorpilor întîrzie puţin şi atinge după 14 zile titrul maxim, comparabil celui obţinut la şoarece, după o injecţie unică de antigen (fig. 276). Antigenele sînt localizate în corpii jugulari, printr-un proces similar localizării intrafoliculare în ganglionii limfatici de la şobolan. În splină, pe lîngă limfocitele rezultate din diviziunea celulelor precursoare stimulate, au fost evidenţiate diferitele stadii de tranziţie de la imfoblast la plasmocitele mature (Borysenko, 1976).

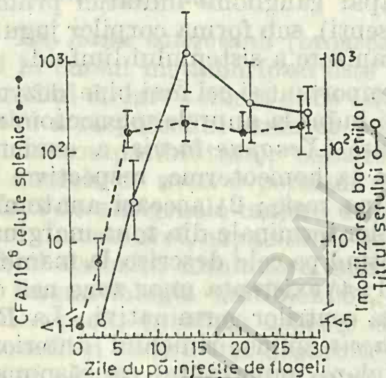


Fig. 276. — Cinetica apariţiei celulelor formatoare de anticorpi şi creşterea titrului anticorpilor imobilizanţi la *Bufo marinus*, după imunizarea primară cu flageli de *Salmonella adelaide*. Fiecare punct reprezintă media geometrică a rezultatelor obţinute la şase animale. Barele verticale indică $\log_{10}$ al deviaţiei standard (după Marchalonis, 1973).

Toate anurele produc Ig cu proprietăţi asemănătoare IgM şi IgG de la mamifere. Rolul IgG este însă mai puţin evident ca la mamifere. Unele antigene T-dependente (hematiile de berbec) sau T-independente (lipopolizaharidele bacteriene) induc numai sinteza de IgM. Altele (proteinele serice heterologe, antigenele virale etc.) produc anticorpi atît cu greutate moleculară mare (tip IgM), cît şi cu greutate moleculară mică (tip IgG). Anticorpii similari IgG apar mai lent ca la mamifere şi înlocuiesc numai parţial IgM, pe parcursul răspunsului imun. După Manning (1979), aceste particularităţi pot fi atribuite exclusiv poikilotermiei.

Un alt fenomen caracteristic anurelor, evidenţiat la *Bufo* şi *Xenopus*, constă în prezenţa unui spectru larg de celule cu morfologie diferită, formatoare de anticorpi, care conţin regiuni extinse ale reticulului endoplasmatic rugos dilatate, în care se stochează mari cantităţi din imunoglobulinele sintetizate. După Cowden şi Dyer (1971), această particularitate ar reprezenta o specializare fiziologică, corespunzînd unui meca-

nism controlat de eliberare a anticorpilor la un organism care produce relativ puține plasmocite și la care răspunsul imun s-ar instala lent. Mecanismul de eliberare a anticorpilor ar putea fi controlat de concentrația antigenelor și/sau a anticorpilor, precum și de temperatura mediului ambiant.

Reptilele sînt, în general, mai puțin studiate și limitat la speciile accesibile broaștele țestoase de mare, șopîrle și aligatori. Nu există nici un fel de date referitoare la speciile cu dimensiuni mari și greu de manipulat.

Ca grup, au un țesut limfoid alcătuit din timus, splină, ganglioni limfatici mici, bine organizați, agregate de celule limfoide intestinale și cloacale. La unele specii au fost semnalate agregate de celule limfoide în vezica urinară și de-a lungul sistemului vascular. Produc cel puțin două clase de Ig, inițial 18S, cu caracter de IgM, și după ~30 de zile, Ig 7S. Catena H a Ig 7S este diferită de catena μ, dar nu este identică cu IgG de la mamifere.

Tabelul nr. 65 prezintă sintetic particularitățile de organizare a țesuturilor limfoide la vertebratele poikiloterme.

Tabelul nr. 65

Evoluția țesuturilor limfoide majore la vertebratele poikiloterme

	Măduva oaselor	Timus	GALT	Organele limfoide secundare majore
Agnatha (Ciclostomi)	Absentă	Absent	Absent	Focare dispersate (inclusiv în rinichi) la *Eptatetrus stouti*
Pești (alți)	De regulă absentă	Prezent	Absent	Splină, rinichi, rinichiul cefalic
Urodele	De regulă absentă	Prezent	Absent	Splină. Plasmocite în regiunea perihepatică
Anure	Prezentă	Prezent	Prezent	Splină, rinichi, ganglioni limfatici primitivi
Reptile	Prezentă	Prezent	Prezent	Splină, ganglioni limfatici primitivi

Influența temperaturii asupra răspunsului imun

Reactivitatea imunologică a poikilotermelor este influențată de variațiile temperaturii mediului ambiant, care, în cazul animalelor terestre, pot suferi uneori variații sezoniere extreme.

Fenomenul a fost observat inițial de Metchnikoff (1901), care a demonstrat că aligatorii produc rapid anticorpi anti-toxină tetanică numai la temperaturi ambiante relativ ridicate. Cercetări mai recente, în condiții

experimentale superioare (măsurarea temperaturii cu sonde termistor cloacale), au confirmat aceste date, la vertebrate provenite din zonele deșertice ale Californiei.

Dipsosaurus dorsalis (iguana de deșert) și *Sauromalus obesus* produc anticorpi anti-*Salmonella* în condiții optime la temperatura de 35°C. La temperaturi mai mici, 25°C, răspunsul este cel mai adesea suprimat sau mult întîrziat și pozitiv la un titru foarte scăzut (fig. 277).

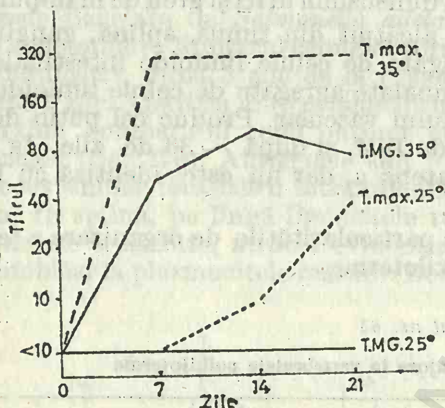


Fig. 277. — Dinamica formării anticorpilor anti-*Salmonella*, în funcție de temperatura ambiantă, la *Dipsosaurus dorsalis*. T. max. — titrul maxim individual la un anumit organism din grupul respectiv; TMG — titrul medie geometrică pentru fiecare grup (după Evans și colab., 1965).

Studiile lui Avtalion și colab. (1973), la crap (*Cyprinus carpio*), au arătat că temperatura își exercită influența numai asupra unor anumite faze ale răspunsului imun. Astfel, faza de recunoaștere a antigenului este independentă de temperatură, în timp ce fazele de interacțiune celulară, de proliferare și de maturare a limfocitelor, ca și cea de sinteză și de secreție a anticorpilor sînt termodependente. Un rol semnificativ au fenomenele de adaptare, fapt demonstrat în cazul peștilor de apă rece, care pot produce anticorpi la temperatura normală a habitatului lor.

Dependența de temperatură are și alte manifestări. Astfel, s-a demonstrat scăderea marcată a titrului complementului, precum și prelungirea duratei de supraviețuire a alogrefelor la broaștele care hibernează (Green și Cohen, 1977).

Persistența îndelungată (> 1 an) a anticorpilor la poikiloterme ar explica protecția lor în perioadele reci, cînd răspunsul imun este diminuat sau uneori chiar complet abolit. Nu se știe însă dacă acest fenomen, observat de Coe și Peel (1970), este efectiv determinat de persistența anticorpilor sau de o producere continuă într-un ritm care compensează cantitatea de anticorpi pierdută prin catabolism.

Imunobiologia păsărilor

Sistemul imunitar al păsărilor este foarte eficient și, din mai multe puncte de vedere, comparabil cu cel al mamiferelor.

Ca dezvoltare, organizarea țesutului limfoid are un caracter intermediar între pești, amfibieni și reptile, pe de o parte, și mamifere, pe de alta.

Între particularităţile primitive de organizare sînt de amintit prezenţa colecţiilor de celule limfoide, dispersate în organism, şi absenţa unor ganglioni limfatici similari celor de la mamifere.

În schimb, ca şi la mamifere, ţesutul limfoid are două compartimente limfoide diferenţiate, unul al celulelor T, răspunzător de imunitatea mediată celular, şi celălalt, al celulelor B, pentru producerea şi secreţia anticorpilor.

Trăsătura fundamentală unică în natură este reprezentată de diferenţierea celulelor B într-un organ anatomic distinct, bursa cloacală sau bursa lui Fabricius. Prezenţa ei ar constitui o adaptare menită să grăbească şi să amplifice diferenţierea celulelor B, pentru a asigura protejarea puiului, imediat după ecloziune. Bursa apare în ziua a 5-a de viaţă embrionară, ca un diverticul al cloacei, şi este colonizată de celulele-stem prebursale („Prebursal stem-cells") după 8 – 14 zile de incubaţie. Aceste celule migrează prin mezenchimul bursal, unde pot da naştere la granulocite. Cînd ajung în epiteliul bursal, induc formarea de foliculi limfoizi. În interiorul fiecărui folicul are loc diviziunea celulelor-stem bursale („Bursal stem-cells"), ce dau naştere unei populaţii de celule, care poartă pe suprafaţă molecule de IgM, ca receptor de antigen (fig. 278).

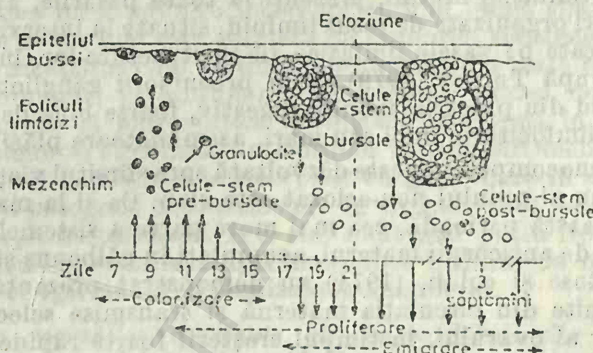


Fig. 278. — Reprezentare schematică a morfogenezei celulelor B bursale (după Weil şi Reynaud, 1987).

Din punct de vedere imunologic, dezvoltarea ontogenetică a acestui compartiment se realizează în două faze succesive (Weil şi Reynaud, 1987):

1) Faza intraembrionară, care include colonizarea spaţiului bursal, producerea a $\sim 10^4$ foliculi şi expansiunea clonelor de celule B. În ziua a 20-a de dezvoltare embrionară, $\sim 90\%$ din celulele bursale sînt limfocite B;

2) Perioada consecutivă ecloziunii, în cursul căreia are loc „însămînţarea" celulelor bursale la periferie şi expansiunea foliculilor limfoizi.

După aproximativ 4 săptămîni, numărul celulelor care au migrat din bursă, sub formă de celule-stem postbursale („Post bursal stem-cell"), este suficient de mare pentru a asigura puiului matur stocul de celule B periferice adecvat unui răspuns imun eficient. Ulterior, bursa involuează

şi odată cu aceasta dispar şi celulele-stem multipotente timpurii. După involuţia ei, funcţia de diferenţiere a celulelor B este preluată de măduva oaselor (Weil şi Reynaud, 1987).

În afară de rolul major ca organ limfoid primar, bursa poate fi implicată activ în producerea unui răspuns imun faţă de antigene administrate local (Sorvari şi colab., 1977). Fenomenul ar avea loc şi natural, deoarece s-a demonstrat experimental posibilitatea înglobării particulelor şi a microorganismelor de pe marginile regiunii cloacale, prin mişcări ca de sucţiune („Cloacal drinking"), urmată de transportarea lor în lumenul bursei prin retroperistaltism. În aceste cazuri, limfocitele bursale ar secreta anticorpi, asigurînd apărarea imunitară locală.

Timusul, foarte activ la organismele tinere, suferă un proces de regresie progresivă la începutul maturităţii sexuale. Bacchus şi Kendall (1975) au adus unele probe privind posibilitatea unei reactivări, asociată cu ciclul de reproducere şi conectată, probabil, cu o funcţie hematopoetică.

Organele limfoide secundare sînt reprezentate de splină, măduva oaselor, nodulii limfatici murali din peretele intestinal, din regiunea oculonazală, precum şi de o serie de mici focare de noduli solitari, dispersaţi în organism, caracteristici pentru păsări.

Nodulii limfatici murali, prezenţi la toate păsările, apar sub forma unor acumulări organizate de ţesut limfoid, situate la intervale neregulate, fie strîns aplicate pe vasele limfatice, fie în structura lor, în special la gît şi membre. După Turner (1979), ar fi precursorii ganglionilor limfatici. Ţesutul limfoid din peretele tubului digestiv, foarte bine dezvoltat, apare ca acumulări limfocitare, mici sau mari, asemănătoare plăcilor Peyer.

Deşi imunocompetenţa este dezvoltată spre sfîrşitul vieţii embrionare, răspunsul imun al puiului nou-eclozat este slab. Ca şi la mamiferele nou-născute, în această perioadă, cea mai mare parte a sistemelor de apărare este asigurată de anticorpii materni, acumulaţi în gălbenuş şi albuş (Brambell, 1970). Rose şi colab. (1974) au demonstrat prezenţa în gălbenuş a IgG, provenite din circulaţia maternă şi transmise selectiv, prin epiteliul folicular al ovarului, în timpul creşterii foarte rapide a ovocitului. În albuş, ca şi în intestin, s-a evidenţiat, spre sfîrşitul perioadei de incubare, prezenţa anticorpilor de tip IgM şi IgA, întîlniţi şi în secreţiile oviductului. În cursul incubaţiei, albuşul se revarsă în amnios, pentru a se amesteca cu lichidul amniotic, care apoi este înghiţit de embrion, ajungînd în căile respiratorii şi în intestin. Anticorpii de tip IgG, prezenţi în ser la embrionul în curs de dezvoltare şi la puii recent eclozaţi, ar proveni din gălbenuş, din care ar trece prin circulaţia vitelină şi hepatică.

Aceste particularităţi diferite de transfer a Ig, în funcţie de clasa căreia aparţin, au echivalenţe şi la mamifere: 1) transferul IgG transovarian ar corespunde transmiterii prin placentă; 2) obţinerea IgA şi IgM, prin înghiţirea lichidului amniotic care conţine albuş, seamănă cu transmiterea prin lapte.

Filogenia imunoglobulinelor

Apariţia moleculelor de imunoglobuline, atît sub formă secretată, cît şi ca receptori de antigen pe suprafaţa celulelor B reprezintă o inovaţie a vertebratelor. Ele nu înlocuiesc, ci se adaugă aglutininelor şi substan-

ţelor bactericide ale nevertebratelor, care sînt structural şi funcţional diferite.

La poikiloterme (peştii elasmobranhiaţi, teleostei şi amfibienele anure) a fost evidenţiată prezenţa imunoglobulinelor pe suprafaţa timocitelor. Ruben şi colab. (1977) au demonstrat că la carasul auriu (*Carassius auratus* — „Gold fish") imunoglobulinele membranare ale timocitelor au rolul de receptori funcţionali de antigen. Ele sînt sintetizate efectiv de către timocite, deoarece după „bonetare" şi endocitoză reapar pe suprafaţa celulelor. Exprimarea Ig pe suprafaţa timocitelor este mult redusă la sfîrşitul metamorfozei anurelor, fenomen care, cel puţin la *X. laevis*, coincide cu apariţia celulelor T mature, capabile să stimuleze celulele B, pentru a produce anticorpi.

După cum s-a demonstrat, răspunsul umoral apare în cursul evoluţiei, în urma celui mediat celular, respectiv a celui determinat de celulele T. Primele tipuri de Ig apărute au g.m. mare (18 — 19 S) şi sînt asemănătoare clasei IgM de la mamifere. Anticorpii cu greutate moleculară mare au mai multe situsuri de combinare şi, ca urmare, ei reprezintă clasa cea mai adecvată pentru nevoile organismelor inferioare, la care cea mai mare parte a răspunsului imun este produsă local.

Necesitatea de a produce anticorpi cu g.m. mică şi/sau a celor cu catene H diferite de IgM este corelată cu formarea sistemelor circulatorii evoluate, care au apărut cînd vertebratele au trecut la viaţa terestră. După cum s-a demonstrat, la amfibieni, schimbarea vitezei de circulaţie, a presiunii osmotice şi hidrostatice a sîngelui afectează în egală măsură migrarea celulelor şi circulaţia anticorpilor în compartimentele extravasculare, îngreuind deplasarea anticorpilor cu g.m. mare în teritoriile invadate de agenţii patogeni. Tranziţia spre Ig cu g.m. mică s-a făcut treptat, Astfel, anticorpii asemănători IgG sînt mult mai puţin frecvent întîlniţi la amfibieni decît la mamifere. IgA nu au fost întîlnite la nici un poikiloterm, în timp ce IgE sînt strict limitate la mamifere.

Evoluţia regiunilor constante ale imunoglobulinelor înregistrează, de asemenea, mai multe trepte evolutive.

După de Ioannes şi Hildemann (1975) la *Eptatetrus* ar exista numai catene L. Absenţa catenelor H sugerează că divergenţa lor evolutivă s-ar fi produs la nivele filogenetice superioare.

Petromyzon marinus produce anticorpi de două tipuri, 14S şi 6,6 S, ca răspuns la imunizarea cu fagul T2 sau cu hemocianină KHL de la *Megathura*. Cele două tipuri de Ig sînt tetrapeptidice şi conţin două catene uşoare (L), cu g.m. 25 kdal, şi două catene grele (H), cu g.m. 70 kdal, care nu se deosebesc antigenic unele de altele. Unii cercetători le consideră unice, în timp ce alţii atribuie catenelor H oarecare analogie cu catena μ de la mamifere. De asemenea, se consideră că anticorpii de la ciclostomi nu prezintă punţi disulfidice, nici intracatenare, nici intercatenare, menţinerea structurii tetrapeptidice fiind asigurată de un mecanism necunoscut.

Punţile disulfidice apar odată cu catena J la elasmobranhiate, care sînt caracterizate prin apariţia plasmocitelor şi a heterogenităţii limfocitelor, şi prin capacitatea de a răspunde la diferite antigene, prin

producerea iniţial de Ig 18S şi ulterior de Ig 7S. Analiza imunochimică a arătat că ambele tipuri au caracter de IgM, fiind alcătuite din unităţi de bază identice ca greutate moleculară, compoziţie în aminoacizi şi mod de migrare electroforetică. Pe această bază s-a ajuns la concluzia că, în realitate, ele reprezintă forma polimeră şi respectiv forma monomeră a aceleiaşi molecule de anticorp. După unele date, cele două tipuri de molecule ar fi sintetizate separat şi nu ar reprezenta rezultatul conversiei formei monomere la cea polimeră şi nici invers, cum s-a crezut iniţial.

La nivele filogenetice superioare au fost descrise, la toate vertebratele la care au fost căutate, catene de tip Hμ, compuse dintr-un domeniu variabil şi patru domenii constante.

Gradul de polimerizare (L2 μ2)n variază în funcţie de clasa vertebratelor respective, dar este constant la aceeaşi clasă. La amfibieni, reptile şi păsări există mai multe clase de Ig, între care una similară cu IgG de la mamifere. După Stites şi colab. (1984), gena Cγ, asemănătoare celei prezente la mamifere, a apărut prima dată la reptilele tetrapode. În ceea ce priveşte dinamica răspunsului imun, aceiaşi autori consideră că ea este asemănătoare celei descrise la mamifere, fiind caracterizată prin apariţia iniţială precoce a Ig 19S (tip IgM), urmată de formarea de Ig 7S (IgG), care devine tipul major de anticorpi, după 2 — 3 luni de la imunizare. La păsări se observă aceeaşi dinamică, asociată, în plus, cu producerea de IgA. Prezenţa IgE a fost descrisă la şoarece, şobolan, iepure, cîine, maimuţă şi om. În plus, la mamifere apar subclasele de Ig, care diferă între ele prin mobilitatea electroforetică, prin structura antigenică şi prin proprietăţile lor biologice. Evoluţia IgD este necunoscută, în principal datorită dificultăţilor de studiere, corelate cu concentraţia mică în ser, sensibilitatea mare la degradare şi lipsa, cel puţin aparentă, a unor funcţii care ar putea facilita identificarea.

După Goodman (1984), apariţia catenelor uşoare (L), similare catenelor k şi λ de la om, ar fi posibilă la peştii osoşi şi la reptile. Existenţa lor a fost evidenţiată la unele păsări şi la toate mamiferele la care au fost căutate. În toate cazurile, ambele tipuri de catene se pot asocia cu orice clasă şi subclasă de catenă H, pentru a forma molecule tetrapeptidice funcţionale, cu o anumită specificitate. Gradul de similaritate în secvenţa aminoacizilor în catenele k şi λ este mai mare decît cel descris între catenele H, μ şi γ. Acest fapt sugerează că divergenţa k/λ s-a produs ulterior celei dintre catenele μ şi γ, probabil după divergenţa mamiferelor de la amfibieni (Goodman, 1984) (fig. 279, tabelul nr. 66).

Evoluţia regiunilor variabile ale imunoglobulinelor. Anticorpii circulanţi ai vertebratelor cele mai primitive au regiuni variabile (V) foarte heterogene. Mecanismele determinante ale formării lor sînt prezente la organisme ce aparţin unor filumuri, care s-au separat acum ~ 300 milioane de ani.

Studiul comparativ al secvenţei aminoacizilor în regiunile variabile ale catenelor uşoare (LV) de la elasmobranhiate, rechini şi om a evidenţiat existenţa unor omologii în regiunea NH_2-terminală, care apare ca fiind cea mai bine conservată. Această observaţie permite, după Goodman (1984), ipoteza că apariţia imunoglobulinelor este determinată de funcţia lor cea mai fundamentală, respectiv de funcţia de recunoaştere.

Tabelul nr. 66

Prezența diferitelor clase și subclase de imunoglobuline la unele vertebrate

	Clasele și subclasele				
	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Petromyzon	?	IgM	?	?	?
Alte grupuri de pești	?	IgM	?	?	?
Amfibieni	IgG	IgM	?	?	?
Reptile	IgG	IgM	?	?	?
Păsări	IgG	IgM	IgA	?	?
Cal	IgGa, IgGb, IgGc, IgGT	IgM	IgA	?	?
Vacă	IgG2, *—, —, IgG1	IgM	IgA	?	?
Cîine	IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgGT	IgM	IgA	?	IgE
Iepure	IgG2, —, —, IgGT	IgM	IgA1, IgA2	?	IgE
Cobai	IgG2, —, —, IgG1	IgM	IgA	?	IgE
Șobolan	IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG1	IgM	IgA	?	IgE
Șoarece	IgG2a, IgG2b, —, IgG1	IgM	IgA1, IgA2	IgD	IgE
Maimuță	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Cimpanzeu	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Om	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	IgM1, IgM2	IgA1, IgA2	IgD	IgE

*Semnul — indică absența unor subclase adiționale corespunzătoare celor de la om;
Semnul? indică lipsa informațiilor privind prezența la organismele studiate.

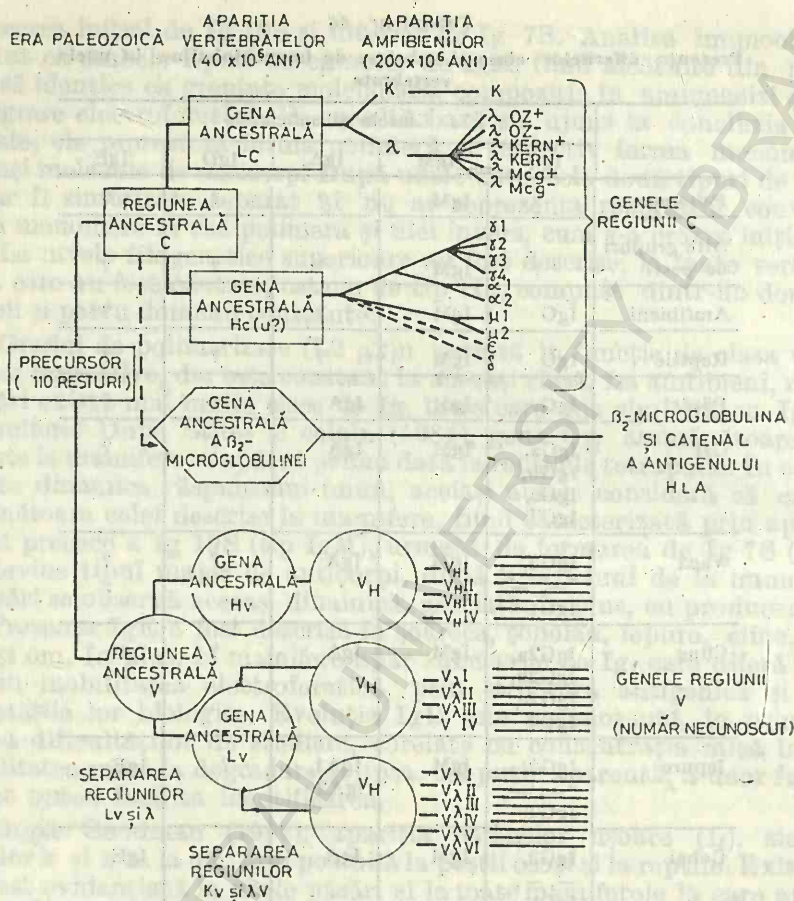


Fig. 279. — Reprezentarea schematică a evoluţiei posibile a genelor ce codifică polipeptidele din structura Ig şi β-2-microglobulinei (după Goodman, 1984).

Reacţiile de respingere a transplantelor alogenice la vertebrate

Deşi au fost studiate doar la un număr foarte limitat de specii, se poate spune că toate clasele de vertebrate pot recunoaşte şi distruge ţesutul de alogrefă, respingînd accelerat alogrefele identice secundare.

Clasa *Agnatha* prezintă capacitatea de respingere a grefelor alogenice prin reacţii inflamatorii cronice tipice, asociate cu distrugerea melanoforilor, infiltrare limfocitară, hemoragii capilare, respectiv cu multe aspecte similare etapelor caracteristice asociate cu respingerea grefelor la vertebratele superioare, inclusiv la mamifere.

Atît la *Eptatretus stouti* („Hagfish"), cît şi la *Petromyzon marinus* („Lamprey") a fost evidenţiată existenţa memoriei imunologice specifice, demonstrată prin prezenţa fenomenelor de respingere acută de tip secundar.

La rechinul cu coarne, *Heterodontus francisci* („Hornshark"), peşte cartilaginos relativ primitiv, a fost descrisă capacitatea de respingere

cronică a alogrefei primare. Fenomenele de respingere evoluează progresiv mai rapid, pentru a culmina cu reacţii de tip acut, după cea de-a patra serie de alogrefe. Analiza fenomenelor de respingere a transplantelor la unii peşti cartilaginoşi, evidenţiază unele caracteristici proprii sistemelor slabe (minore) de histocompatibilitate de tipul sistemului non-H-2 de la şoarece.

Peştii osoşi (*Teleostei*) prezintă unele fenomene de tranziţie evolutivă în imunitatea faţă de transplante. Speciile studiate sînt caracterizate prin prezenţa a cel puţin 10 — 15 locusuri independente de histocompatibilitate, ceea ce corespunde unui nivel mai important de complexitate imunogenetică. Corelat cu această diversificare, apar fenomenele de respingere primară subacută şi de respingere viguroasă acută a grefelor secundare.

Tendinţa de diversificare a răspunsului imun continuă la *amfibieni*. În timp ce apodele şi urodelele au capacitatea de respingere cronică, asociată cu prezenţa unor sisteme slabe de histocompatibilitate, amfibienii mai evoluaţi (*Anura*) prezintă reactivitate de tip acut.

Tendinţa de evoluţie este evidentă şi la *reptile*, *păsări* şi *mamifere*.

Patru ordine de reptile testate prezintă fenomene de respingere cronică a alogrefelor, în timp ce la păsări şi la mamifere fenomenele de respingere acută sînt deosebit de intense. La mamifere, respingerea cronică este caracteristică pentru antigenele slabe de histocompatibilitate. Capacitatea de respingere acută (debut după 1 — 3 săptămîni; durata cîteva zile), semnalată la unii peşti amfibieni, evoluaţi, ca şi la unele păsări, reflectă probabil prezenţa unor antigene de transplantare similare celor descrise la şoarece şi la alte animale, precum şi existenţa mecanismelor citotoxice şi a unor molecule de tip CMH din clasele I şi II, care au evoluat, după cît se pare, asociat. La vertebratele superioare apar şi fenomene de respingere cronică, cu debut întîrziat (după cîteva luni) şi cu evoluţie lentă (săptămîni).

După Borysenko (1976), studiul antigenelor de transplantare şi al genelor care le controlează evidenţiază tendinţa lor netă de evoluţie în liniile majore ale arborelui filogenetic. Există probe atît directe, cît şi indirecte că această tendinţă reflectă evoluţia sistemelor de histocompatibilitate, de la cele care au un număr mare de antigene de transplantare slabe spre cele care au un singur complex de antigene de histocompatibilitate puternic („major"). Acestea s-ar putea forma fie prin achiziţia treptată de noi specificităţi antigenice, fie prin asocierea mai multor specificităţii minore (slabe), care apoi se manifestă ca aloantigene puternice.

În concluzie, se poate afirma că funcţia de imunorecunoaştere fină a diferenţelor subtile dintre organisme, prin intermediul markerilor alogenici, este o caracteristică a tuturor grupelor majore de animale multicelulare. Sistemele de recunoaştere de tipul CMH de la mamifere au evoluat, probabil, din cele ale nevertebratelor (Hildemann, 1980).

Particularităţile generale ale imunobiologiei vertebratelor

Sistemul imunitar al vertebratelor, în general, este suprapus pe mecanismele de apărare primitive, nespecifice, bazate în principal pe fagocitoză şi pe o varietate de substanţe antimicrobiene umorale. El nu

înlocuiește aceste mecanisme, ci, dimpotrivă, devine progresiv mai legat de ele, prin interacțiunile realizate în toate etapele răspunsului imun, de la înglobarea, prelucrarea și prezentarea antigenelor de către macrofage pînă la eliminarea finală a agenților patogeni, prin imunofagocitoză sau prin liza mediată de sistemul complement. În aceste interacțiuni, moleculele de recunoaștere ale celulelor sistemului imunitar (Ig și receptorii de antigen ai celulelor T) aduc un anumit rafinament în discriminarea self—nonself, în comparație cu mecanismele mai vechi, cum este, spre exemplu, fagocitoza, care prin însăși natura ei are o specificitate intrinsecă mult redusă.

În organizarea țesutului limfoid, una din particularitățile majore, sugerată de studiile de imunologie comparată, este tendința progresivă spre centralizarea producerii celulelor imunocompetente, în organe limfoide primare și secundare distincte. Aceasta înseamnă trecerea de la țesuturi limfoide relativ dispersate la organe înalt structurate și de la reacții *in situ*, față de o infecție, la organizarea unui răspuns regional organizat, avînd ca sediu ganglionii limfatici ai mamiferelor. În acest context, răspunsul imun are drept cadru participarea structurilor fundamentale adecvate unui răspuns local, bine controlat, asociate cu o reacție generală, determinată de faptul că aceste structuri fac parte dintr-un sistem imunitar global, înalt integrat (fig. 280).

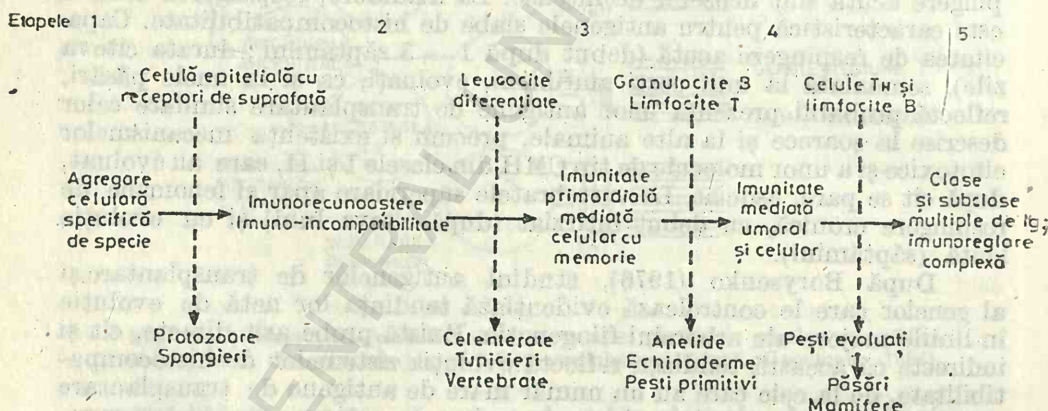


Fig. 280. — Etapele majore ale filogeniei reactivității imunitare, stabilite pe baza datelor experimentale acumulate în ultimii ani. Imunocompetența specifică este evidentă într-o formă primitivă încă de la celenterate. Imunitatea mediată celular cu memorie este detectată inițial la nevertebratele evoluate. Evoluția progresivă și diversificarea funcțiilor imunocitelor au loc pe fondul menținerii manifestărilor timpurii ale reactivității imunitare (după Cooper, 1982).

Pe acest parcurs, de la vertebratele primitive la mamifere, complexitatea citoarhitecturală a organelor limfoide primare și secundare crește la fiecare nivel evolutiv. Pe măsură ce organizarea devine mai complexă, apar noi elemente structurale și funcționale, mai specializate, asociate cu o diversificare a tipurilor de celule imunocompetente și a anticorpilor, cu modalități de recunoaștere mai subtile și mecanisme de reglare tot mai sofisticate.

Prima clasă de vertebrate, agnatele, prezintă un sistem imunitar descentralizat. La nivelul lor, celulele sistemului imunitar se dezvoltă

și răspund la stimulările antigenice în microambianța țesutului conjunctiv (spre exemplu, în lamina propria a intestinului).

La clasele de vertebrate poikiloterme mai evoluate, organele limfoide devin progresiv mai complexe și inducția răspunsului imun treptat progresiv corelată cu funcțiile timusului.

Acesta apare prima dată la amfibieni, fiind descris la *Rana pipiens*. La *Xenopus laevis* se găsește direct sub piele, înapoia urechii mijlocii. În structura sa a fost descrisă o regiune corticală ce conține limfocite cu diviziune rapidă și o altă medulară, cu structură mai heterogenă (mai puține limfocite, celule mioide și epiteliale, corpusculi Hassal etc.). Celulele mioide au nucleul înconjurat de miofibrile striate, dispuse în inele concentrice. Rolul lor nu este cunoscut. Se bănuiește că ar reprezenta o sursă de antigene-self sau că ar participa în ameliorarea circulației lichidelor tisulare. Produsul major al timusului amfibienilor este reprezentat de celule cu proprietățile funcționale ale limfocitelor T.

Rinichiul apare ca organ limfoid major la unii pești și la amfibieni, la care funcționează ca sursă de limfocite T și B. Această funcție dispare la amniote.

Splina reprezintă organul limfoid major al vertebratelor din subîncrengătura *Gnathostomata* (gr. „gnathos" — falcă ; „stoma" = gură), care include peștii (cu excepția ciclostomilor), amfibienii, reptilele, păsările și mamiferele. Existența zonelor diferențiate T-dependente (pulpa roșie perifoliculară) și T-independente (foliculii din pulpa albă) a fost evidențiată începînd de la *Xenopus laevis*. Ea captează antigenele în teritoriile corespunzătoare și reprezintă organul în care au loc stimularea și activarea limfocitelor, care apoi sînt eliberate în circulație sau sînt supuse diferențierii în celule producătoare de anticorpi.

Nodulii limfomieloizi, aparent asemănători ganglionilor limfatici, sînt organe limfomieloide cu o structură net diferită. Funcția lor principală este de filtrare a sîngelui, potențial asociată cu aceea de fixare a substanțelor prezente în limfă. Apar pentru prima dată la anumiți amfibieni din ordinul *Anura*.

O particularitate interesantă a vertebratelor poikiloterme decurge din faptul că producerea de imunoglobuline precede apariția plasmocitelor și a țesutului limfoid organizat.

Vertebratele homeoterme marchează o altă etapă de centralizare evolutivă a funcțiilor imunitare și de perfecționare arhitecturală, corespunzătoare apariției ganglionilor limfatici și a centrilor germinativi din organele limfoide periferice. Structura complexă a organelor limfoide la vertebratele homeoterme reflectă o mai mare eficiență și diversitate în capacitatea de a elabora un răspuns imun eficient și o memorie imunologică de lungă durată.

După Manning (1979), în afară de homeotermie, alți doi factori au avut un rol stimulator puternic, evolutiv, în apariția diversității și eficienții mărite a sistemului imunitar al păsărilor și mamiferelor :

1) Menținerea stadiului de larvă care trăiește liberă, în cursul evoluției amfibienilor, și vulnerabilitatea acestora față de multe infecții din mediu au determinat necesitatea maturării rapide a căilor care asigură un răspuns imun viguros. probabil în dauna unei diferențieri mai avansate a acestora.

2) Prezenţa amniosului la reptile, păsări şi mamifere asigură protecţia embrionului şi face ca nevoia de a produce celule imunocompetente mature să fie mai puţin urgentă. Acest fenomen permite diversificarea specificităţii, prin rearanjări genetice şi formarea populaţiilor limfocitare complexe, înainte de apariţia „angajării" lor funcţionale.

Heterogenităţii funcţionale a limfocitelor, iniţiată la peşti şi continuată la amfibieni şi păsări pînă la mamifere, îi corespunde diversificarea funcţională a imunoglobulinelor, evidenţiată de apariţia (pe lîngă IgM) a celorlalte clase şi subclase de anticorpi (tabelul nr. 62). Acestor particularităţi li se adaugă apariţia, încă de la amfibieni, a interacţiunilor cooperante de tip T—B, a controlului prin supresie şi a unor mecanisme de reglare a răspunsului imun, progresiv mai subtile şi mai eficiente.

Genele şi respectiv produşii complexului major de histocompatibilitate sînt prezenţi şi la vertebratele primitive. Polimorfismul lor este însă minim, astfel încît progresul evolutiv este asociat cu creşterea complexităţii şi diversificarea sistemelor majore de histocompatibilitate.

Sistemul complement. Cu excepţia agnatelor, care nu au decît unii compuşi terminali ai căilor clasică şi alternativă de activare, sistemul complement este prezent, cu ansamblul constituenţilor săi, la toate vertebratele. Este probabil că genele care codifică sinteza lor au apărut aproape în acelaşi timp, deşi, după unele date, constituenţii căii alternative ar fi filogenetic mai vechi (Day, 1974). Capacitatea complexelor antigen-anticorp de a fixa complementul este prezentă la toate vertebratele superioare nivelului ciclostomilor.

Tabelul nr. 67 prezintă particularităţile de evoluţie a constituenţilor sistemului imunitar la diferitele clase de vertebrate.

Tabelul nr. 67

Emergenţa caracteristicilor fundamentale imunologice la vertebrate (după Marchalonis şi Cone, 1973)

Clasele	Timus	Splină	Ganglioni limfatici	Bursa lui Fabricius	Limfocite	Plasmocite	Anticorpi	Respingerea grefelor
Ciclostomi								
Petromyzon	PRIM	PRIM	—	—	+	—	+	+
Mixine	ND	ND	—	—	+	—	+	+
Elasmobranhiate								
primitive	+	+	—	—	+	—	+	+
evoluate	+	+	—	—	+	+	+	+
Holostei	+	+	—	—	+	+	+	+
Amfibieni								
Urodele	+	+	—	—	+	+	+	+
Anure	+	+	PRIM	—	+	+	+	+
Reptile	+	+	PRIM	?	+	+	+	+
Păsări	+	+	—	+	+	+	+	+
Mamifere								
Prototerieni	+	+	+	Echivalent	+	+	+	+
Metaterieni	+	+	+	Echivalent	+	+	+	+
Euterieni	+	+	+	Echivalent	+	+	+	+

PRIM — primitiv; ND — nedetectat; Echivalent — prezenţa unei structuri limfoide care ar putea înlocui.

HIPERSENSIBILITATEA

„Aria ignoranței noastre asupra esenței fenomenelor alergice este mai extinsă decît cea a noțiunilor ce pot fi considerate ca definitiv dobîndite"

A. SAPONARO

„Hipersensibilitatea reprezintă o reacție a mecanismelor imunitare față de o substanță străină, deformată pentru un motiv sau altul, în așa fel încît produce tulburări care se pot extinde de la neplăceri minore pînă la o boală fatală".

F. M. BURNET

HIPERSENSIBILITATEA

„Aria ignoranței noastre asupra esenței fenomenelor alergice este încă extinsă deși cea a conjuncturii se pot fi considerate ca definitiv dobândite".

A. SAPONARO

„Hipersensibilitatea reprezintă o reacție a organismelor multicelulare față de o substanță străină, de natură chimică sau alta, în așa fel încât produce tulburări care se pot extinde de la jenă minoră până la o boală fatală".

F. M. BURNET

Hipersensibilitatea

(Pl. 34–40)

„Alergia este o perturbare a sistemului imunitar, expresia unei imunităţi rău reglate...”

P. Buisseret

Conceptele de imunitate şi de răspuns imun au fost asociate, în special, cu efectele lor benefice, protectoare, asupra organismelor, faţă de agresiunile diferiţilor agenţi patogeni sau substanţe străine din mediu. Existenţa unor cazuri specifice în care efectele răspunsului imun pot avea influenţe negative asupra organismului au fost semnalate de Richet şi Portier (1902). Studiind imunitatea antitoxică la cîine, au demonstrat că animalele imunizate cu toxina extrasă din actinia (anemona de mare) (*Actinaria*) făceau un şoc vascular grav, colaps, urmat de moarte, după reinjectarea unei doze de toxină subletală pentru animalele-martor neimunizate. Reacţia a fost considerată ca opusă stării de apărare („filaxie”) şi a fost denumită *stare de antifilaxie* sau de *anafilaxie* (gr. „ana” = contrar, „filaxis” = protecţie). În sensul său originar, termenul implica, în mod inexact, o creştere a sensibilităţii faţă de substanţa toxică.

În anul 1906, von Pirquet a propus termenul de *alergie* (gr. „allos” = altul; „ergon” = lucru, acţiune), pentru a desemna starea de reactivitate modificată a organismului, faţă de o anumită substanţă specifică, rezultînd, obişnuit, dintr-o experienţă anterioară cu substanţa respectivă sau cu una înrudită. În sensul originar, conceptul de alergie include atît stările de *anergie* (absenţa reactivităţii şi a capacităţii de apărare) şi *hipoergie*, cît şi cele de *hiperergie*, sinonime cu starea de hipersensibilitate. Ca urmare, interpretaţi *stricto sensu*, termenii de alergie şi hipersensibilitate nu sînt sinonimi, deşi sînt folosiţi curent cu aceeaşi semnificaţie. După Roitt, Brostoff şi Male (1986), termenul de alergie este sinonim cu cel de hipersensibilitate imediată.

Dale (1911, 1914) a demonstrat că cele mai multe simptome caracteristice stării anafilactice la cobai sînt produse de histamină. Ulterior, Schultz şi separat Dale au elaborat un model experimental, care permite stabilirea calităţii de antigen sensibilizant, detectarea proprietăţilor de alergen a diferitelor substanţe (medicamente etc.), precum şi urmărirea şi evoluţia stării de desensibilizare: fragmentele de ileon sau de uter de cobai, provenite de la animale sensibilizate, se contractă *in vitro* (într-o baie de nutrienţi la 37°C, în condiţii de oxigenare), după adăugarea unei cantităţi foarte mici din substanţele utilizate pentru sensibilizare.

Prausnitz şi Küstner (1921) au demonstrat rolul unei substanţe serice — *reagina* — în hipersensibilitate, iar Ishizaka şi Ishizaka (1966) au demonstrat natura reală a acesteia, de imunoglobulină E.

Clasificarea reacțiilor de hipersensibilitate

Reacțiile alergice au fost inițial divizate în două clase majore, în funcție de momentul exprimării lor, în raport cu cel al administrării stimulului declanșator: 1) *reacțiile imediate*, care apar după mai multe minute, și 2) *reacțiile întîrziate*, a căror apariție necesită mai multe ore sau chiar zile. Termenii respectivi sînt folosiți și în prezent într-o accepțiune nouă, implicînd intervenția anticorpilor în reacțiile imediate și a celulelor T sensibilizate în cazul celor mai lente, de tip întîrziat.

Coombs și Gell (1968) au propus clasificarea reacțiilor de hipersensibilitate în patru categorii:

Reacțiile de tip I sau anafilactice sînt rezultatul interacțiunii antigenelor cu o clasă specifică de anticorpi (IgE), legați de receptorii specifici de pe mastocite și bazofile prin intermediul regiunii Fc. Procesul este asociat cu degranularea celulelor respective și eliberarea unor mediatori biologic activi, răspunzători de manifestările reacției.

Reacțiile de tip II sau citotoxice sînt determinate de interacțiunea anticorpilor (IgG sau IgM) cu determinanți antigenici celulari sau legați intim de celule. Răspunsul efectiv este condiționat de intervenția sistemului complement și se manifestă prin opsonizare pentru fagocitoză, aderență imună (prin componentul C3) sau liză, prin activarea complementului sau prin citotoxicitate celulară legată de intervenția celulelor NK.

Reacțiile de tip III, prin complexe imune, sînt rezultatul formării unei cantități mari de complexe antigen — anticorp, care nu pot fi eliminate și, ca urmare, sînt depuse în capilarele sanguine sau pe suprafața țesuturilor, întrerupînd activitățile fiziologice ale celulelor subiacente. Procesul este asociat cu activarea complementului (atracția chemotactică a polimorfonuclearelor, eliberarea de enzime proteolitice și de proteine policationice din granulații, producerea de anafilatoxine și eliberarea de histamină), precum și de agregarea plachetelor (cu formarea de microtrombusuri și eliberarea de amine vasoactive).

Reacțiile de tip IV, mediate celular, au la bază interacțiunea receptorilor specifici de pe suprafața celulelor T cu antigenele și producerea de limfokine, care atrag și activează macrofagele. Răspunsul este tipic față de antigene ca tuberculina, alte antigene bacteriene și fungice, antigene de histocompatibilitate (transplante) și tumorale (fig. 281).

Deși criticată de mulți cercetători, clasificarea lui Coombs și Gell (tabelul nr. 68) are aplicații în imunopatologie.

Ulterior a fost descris un al cincilea tip, **hipersensibilitatea stimulatoare**, produsă de anticorpi ce nu fixează complementul, care prin intermediul unor modificări alosterice induc apariția unor mesaje stimulatoare. Teoretic, stimularea poate să apară și prin producerea de anticorpi față de inhibitorii mitotici prezenți normal în circulație.

Din analiza particularităților prezentate rezultă că tipurile I, II, III și V au caracterul de reacții „imediate", produse prin interacțiunea

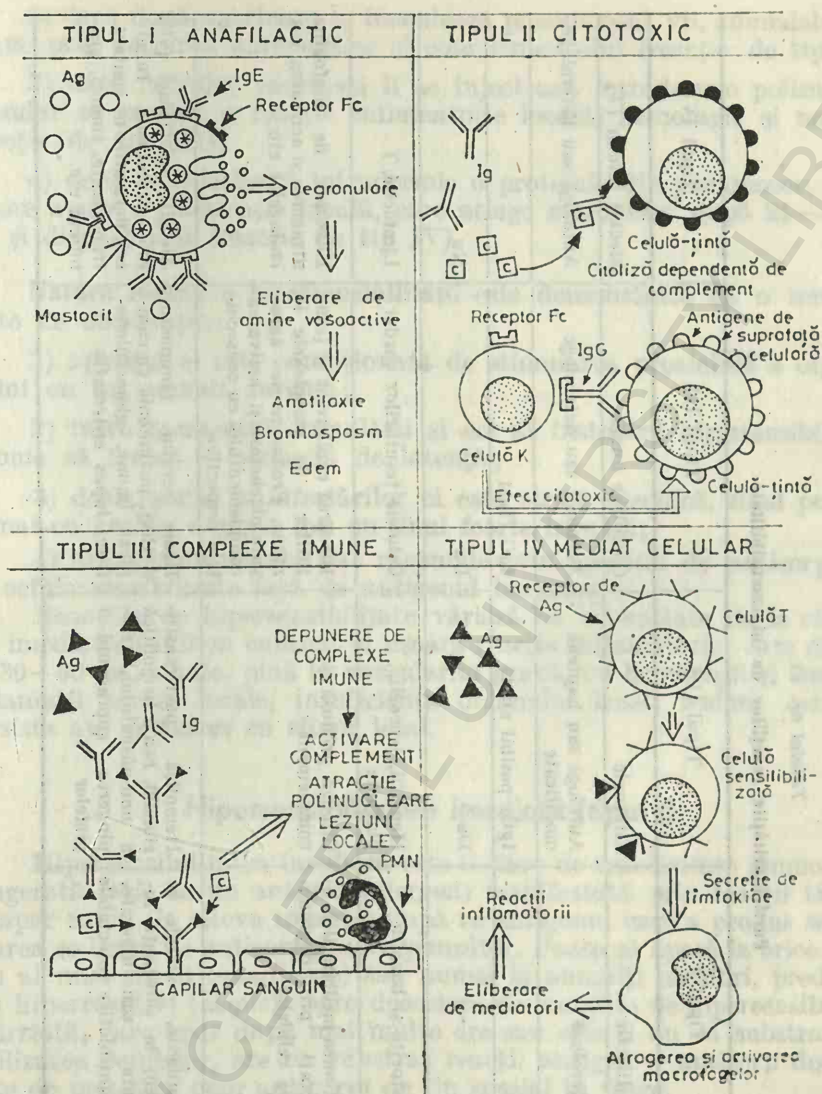


Fig. 281. — Reprezentare schematică a particularităților de evoluție a celor patru tipuri de hipersensibilitate.

antigenelor cu anticorpii umorali, în timp ce tipul IV are caracterul de mediat celular și experimarea de tip întîrziat. Una din criticile aduse clasificării lui Coombs și Gell decurge din faptul că principalele patru tipuri de reacție pot exista asociat, după cum demonstrează experiențele de vaccinare repetată a cobailor cu pneumococi omorîți:

1) dacă se injectează i.v. animalelor vaccinate o soluție de polizaharid capsular de același tip, cobaii mor prin șoc anafilactic acut (reacție de tip I);

Tabelul nr. 68

Particularitățile reacțiilor de hipersensibilitate

	Tipul I	Tipul II	Tipul III	Tipul IV
Mecanismul de bază	Anafilactic	Citotoxic	Complexe imune	Mediat celular (T)
Antigenele implicate	Heterologe	Autologe sau haptene modificate	Autologe sau heterologe	Autologe sau heterologe
Imunoglobulinele	IgE	IgG, posibil altele	IgG, IgM	—
Participarea complementului	Nu	Da	Da	Nu
Celulele implicate	Mastocite și bazofile	Hematii, leucocite, plachete	Celulele țesuturilor gazdei	Limfocite T
Mecanismul molecular și celular	Acțiunea mediatorilor eliberați prin degranularea celulelor	Citoliză produsă de complement	Blocarea capilarelor și țesuturilor de complexele imune. Producere de agregate plachetare și activarea complementului cu consecințele respective.	Eliberare de limfokine, atragerea și activarea macrofagelor etc.
Exemple	Anafilaxie, alergie la polen, la substanțe inhalate sau ingerate, la antibiotice injectabile	Hemoliză posttransfuzională, boala hemolitică a nou-născutului, respingerea supraacută a grefelor	Boala serului, fenomenul Arthus, pneumonia cu complexe imune, glomerulonefrite, lupus eritematos	Alergii infecțioase (virale, bacteriene, fungice), dermatite de contact, transplante, tumori, granulom etc.

2) dacă după vaccinare se inoculează pneumococi vii, animalele sînt imune prin acțiunea anticorpilor și complementului (reacție de tip II);

3) dacă cobailor vaccinați li se injectează intradermic polizaharid capsular se produc o reacție inflamatorie locală, hemoragie și necroză (reacție de tip III);

4) dacă se injectează intradermic o proteină din pneumococ, după 12 ore apare o inflamație locală, care atinge maximum după 24—48 de ore și dispare lent (reacție de tip IV).

Natura imună a hipersensibilității este demonstrată de o serie de fapte de observație:

1) apariția ei este condiționată de stimularea prealabilă a organismului cu un anumit antigen;

2) între momentul stimulării și cel al instalării hipersensibilității trebuie să treacă o perioadă de latență;

3) declanșarea manifestărilor ei este strict specifică, fiind posibilă numai cu același antigen sau cu unul foarte înrudit;

4) organismul sensibilizat răspunde prin apariția de anticorpi sau de celule sensibilizate față de antigenul inductor.

Reacțiile de hipersensibilitate variază ca intensitate de la răspunsul imediat cu eritem cutanat și ușoară reacție inflamatorie, care dispare în 30—60 de minute, pînă la vascularita gravă, cu hemoragii și necroză, inflamații severe locale, insuficiența organului lezat, leziuni care pot persista ani și uneori cu sfîrșit letal.

Hipersensibilitatea imediată (tipul I)

Hipersensibilitatea imediată este o stare de reactivitate imunologică exagerată față de un antigen (alergen) manifestată prin reacții tisulare ce apar rapid (la cîteva minute) după ce antigenul care a produs sensibilizarea se leagă de anticorpul corespunzător. Poate să apară la orice membru al unei specii (*anafilaxie*) sau numai la anumiți membri, predispuși sau hiperreactivi (*atopie*). Spre deosebire de reacțiile de hipersensibilitate întîrziată, care apar după mai multe ore sau zile și au ca substrat sensibilizarea celulelor, are ca substrat reacții antigen — anticorp determinate de prezența unor anticorpi de tip special în sînge.

În unele cazuri, cele două tipuri de hipersensibilitate pot evolua asociat. Spre exemplu, alergia determinată de inhalarea enzimelor proteolitice din detergenți evoluează în două faze: una imediată (după cîteva minute) și alte întîrziată (după 6--8 ore).

Anafilaxia

Reacțiile anafilactice sînt reacții în care celulele diferitelor țesuturi sînt sensibilizate prin legarea anticorpilor homocitotropi (IgE) sau heterocitotropi, cu specificitate pentru diferite antigene externe. Reacția lor cu

antigenele declanșează eliberarea de mediatori farmacologic activi, cu efecte asupra țesutului-,,țintă''.

În funcție de manifestările lor, reacțiile anafilactice au fost grupate în două categorii :

1) *reacții sistemice sau generalizate*, consecutive administrării antigenului pe calea intravenoasă, care îi asigură răspîndirea imediată în tot organismul animalelor sensibilizate ;

2) *reacții locale*, determinate de injectarea extravasculară a antigenelor (intradermic sau subcutanat), la animale sensibilizate activ sau pasiv.

Reacțiile anafilactice au fost provocate la mamifere, păsări, pești și sînt, probabil, comune tuturor vertebratelor la care evoluează cu particularități diferite. Unele specii (hamster) sînt în mod particular refractare. Animalul preferat pentru studiu este cobaiul care răspunde intens și uniform.

Starea de anafilaxie este totdeauna provocată activ sau pasiv.

Substanțele folosite, anafilactogene, sînt proteine, polizaharide, antigene conjugate sau haptene autocuplante. Doza de antigen necesară pentru sensibilizare, variabilă în funcție de specia animală, de natura antigenului, de calea de administrare etc. este în general mică, exceptînd cazul animalelor refractare. La cobai, 0,01—1 mg de proteină solubilă injectată intraperitoneal creează o stare de sensibilizare, care apare după o latență de > 8 zile (necesară pentru sinteza anticorpilor) și atinge maximum după 21 de zile. Injecția declanșantă necesită utilizarea, de preferință, a unui antigen solubil, injectat intravenos sau intracardiac, într-o cantitate mai mare (0,1—1 mg), pentru a asigura saturarea rapidă cu antigen. Raportul optim antigen — anticorp pentru declanșarea anafilaxiei corespunde unui ușor exces de antigen.

După injectarea unor substanțe anafilactogene, fenomenele decurg în șase etape succesive :

1) producerea anticorpilor sensibilizanți ;

2) sensibilizarea anumitor celule specializate (mastocite și bazofile) implicate în reacțiile inflamatorii, prin legarea anticorpilor anafilactici pe suprafața lor ;

3) activarea acestor celule prin legarea antigenelor specifice, care reacționează cu anticorpii legați ;

4) eliberarea de mediatori activi, prin degranularea celulelor sensibilizate ;

5) stimularea contracției mușchilor netezi, inducerea vasodilatației capilare și a permeabilității vasculare crescute ;

6) apariția simptomelor, variabile de la o specie la alta, în funcție de natura organelor-șoc, care sînt în special afectate (tabelul nr. 69) și uneori în funcție de calea de administrare.

Tabelul nr. 69

Particularitățile anafilaxiei la diferite specii animale (modificat după Austern și Humphrey, 1963)

Specia	Situsul principal al reacției („organul-șoc")	Mediatorii biologic activi implicați	Manifestările principale
Om	Pulmon (bronhiole) Laringe	Histamină SRS-A	Dispnee; hipotensiune; eritem și urticarie; emfizem acut; edem laringeal, colaps circulator
Cobai	Pulmon (bronhiole)	Histamină Kinine SRS-A	Tulburări respiratorii: constricția bronhiolelor, emfizem
Șoarece	?	Serotonină Kinine	Tulburări respiratorii; emfizem, insuficiență de cord drept, hiperemie intestinală
Șobolan	Intestine	Serotonină Kinine	Colaps circulator: hemoragii intestinale și pulmonare
Iepure	Cord Vase sanguine pulmonare	Histamină Serotonină Kinine SRS-A	Obstrucția capilarelor pulmonare cu trombusuri de plachete: insuficiență de cord drept: încărcarea cu sînge a vaselor hepatice și intestinale
Cîine	Ficat	Histamină Serotonină Kinine (P)	Stază sanguină hepatică; hemoragii viscerale, abdominale și toracice

Anafilaxia generalizată a cobaiului evoluează cu zbîrlirea părului în regiunea dorsală, agitație, tremurături, strănut, tuse spasmodică, cianoza mucoaselor, vărsături, dispnee, respirație discontinuă și superficială, prostrație, incontinență urinară și fecală, blocaj respirator, convulsii și colaps, urmat de moarte prin asfixie după 5—20 de minute de la administrarea antigenului.

Anafilaxia cîinelui evoluează cu agitație, polipnee, tahicardie, prurit, diaree, incontinență urinară. În cazurile letale apar imediat după injecția antigenului vomismente bilioase și fecaloide, hipotensiune, colaps. Animalele pot supraviețui două ore sau mai mult. Necropsia evidențiază prezența unui edem extensiv al mucoasei intestinale și în pulmon, hemoragii și congestie în ficat (care poate să conțină ~ 60% din sîngele total al animalului din cauza constricției vaselor sanguine hepatice), sîngerări masive etc.

Anafilaxia cutanată pasivă. Practicată inițial la om*, în forma cunoscută astăzi sub denumirea de testul Prausnitz-Küstner, este în prezent efectuată numai la animale, datorită riscului de transmitere a hepa-

* Transferul pasiv al alergiei prin ser de la bolnav s-a realizat inițial (1921), prin transferul de ser de la Küstner (alergic la pește) în pielea lui Prausnitz (alergic la polen). Injectarea ulterioară a unui extract antigenic din pește a produs o indurație inflamatorie locală acută, cu prurit, eritem urticarian, permeabilitate vasculară crescută etc.

titei B. La modul general, anafilaxia pasivă este o formă localizată de hipersensibilitate imediată, realizată prin injectarea unei cantităţi mici de ser foarte diluat, provenit de la un donator sensibilizat activ, la un receptor normal, din aceeaşi specie. După un interval de 24—72 de ore, necesar pentru fixarea anticorpilor din serul injectat pe suprafaţa celulelor, se realizează o sensibilizare pasivă a unei mici zone din piele. Injecţia declanşatoare de antigen asociat cu un colorant special (albastru Evans) este urmată (după ~ 6 ore) de apariţia unei zone delimitate, colorată în albastru, determinată de difuzia colorantului, consecutivă creşterii permeabilităţii capilare locale. Reacţia atinge intensitatea maximă după 24—72 de ore. După sensibilizare, datorită afinităţii mari de legare a IgE de receptorii respectivi, ţesuturile rămîn sensibilizate trei săptămîni la şobolan şi şase săptămîni la om.

În practicarea testului de anafilaxie pasivă trebuie ţinut seama de faptul că anticorpii anumitor specii nu sînt totdeauna capabili să transmită această stare altor specii. Astfel, cobaiul, animalul de elecţie pentru studiile de anafilaxie, poate fi sensibilizat pasiv cu anticorpii de om, de maimuţă şi de iepure, nu însă şi cu cei de la păsări, şobolan, cal şi bovine.

Atopia

Descrisă de Coca şi Cooke (1929), atopia reprezintă un tip de hipersensibilitate imediată decurgînd din tendinţa individuală, determinată de influenţe ereditare, de a produce *spontan* mari cantităţi de IgE faţă de antigene comune din mediu. Hipersensibilitatea atopică (gr. „atopos" = neobişnuit, ciudat) reprezintă o formă anormală de reactivitate imunologică, în care producerea de IgE este legată de expunerea obişnuită, în condiţii naturale, la alergene (*atopene*) din mediul extern, fie după inhalarea, fie după ingerarea sau contactul epidermic cu acestea. Are o frecvenţă de ~10% în populaţie.

Atopia are următoarele particularităţi generale:

1) este prezentă şi practic limitată la om (apare numai excepţional la cîine şi şobolan);

2) este determinată de antigene speciale (atopene), slab imunogene;

3) predispoziţia la sensibilizare este moştenită ereditar;

4) evoluează frecvent cu manifestări clinice cu localizări multiple (de exemplu, piele şi pulmon). Evoluează ca o alergie multiplă, cu tendinţă de agravare şi polisensibilizare;

5) este determinată de anticorpi de tip special, IgE (reagine);

6) poate fi transmisă pasiv local prin injectarea serului sanguin, în piele la un organism normal.

Manifestările clinice sînt foarte diferite în funcţie de afectarea unuia sau mai multor organe primare („Shock organs"), cu afectarea sistemului respirator (mucoasa nazală, respiratorie, bronhiile), conjunctivei, pielii, intestinului (vărsături, dureri abdominale, diaree etc.), căilor urinare sau

sistemului vascular, sistemului nervos central (dureri de cap, simptome neurologice etc.) etc.

Formele clinice cele mai cunoscute sînt : *febra de fîn*, *astmul bronhic*, *urticaria*, *edemul angioneurotic*, *alergiile alimentare* (la fragi, căpşuni etc.), *dermatita* (*eczema*) *atopică*. La copii predomină alergiile alimentare (lapte, ouă, căpşuni, portocale, ciocolată, peşte, alune etc., cu inflamaţia mucoasei bucale, ulceraţii dureroase, greaţă, diaree) şi eczemele, care dispar după vîrsta de 5 ani.

Febra de fîn este rezultatul răspunsului atopic la polenul de *Ambrosia*, *Artemisia*, *Parietaria officinalis*, graminee sălbatice, ulm, stejar, secară, timoftică (*Phleum pratense*) ş.a. Deşi *Ambrosia elatior* („Ragweed") produce într-un sezon ~ un milion de grăuncioare de polen, sensibilizarea atopică se face cu doze foarte mici (fiecare individ este expus într-un sezon la ~ 1 μg de polen). Purtat de aer, acesta vine în contact cu mucoasele oculare şi nasofaringiene, inducînd sensibilizarea. Reexpunerea sezonieră determină inflamaţii oculare pruriginoase, strănut, hidroree, obstrucţie nazală, tulburări respiratorii. Fenomenele se atenuează, de regulă, după o zi umedă (fig. 282).

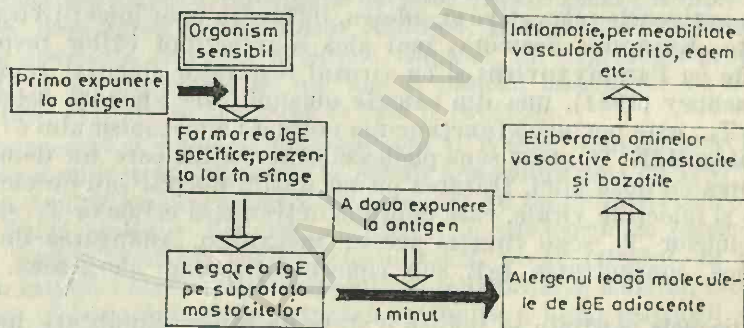


Fig. 282. — Secvenţa evenimentelor ce determină reacţiile de hipersensibilitate de tip atopic.

Patogenia atopiei. Prezenţa reacţiilor atopice numai la un număr limitat de persoane expuse la antigenele din mediu a determinat formularea mai multor ipoteze, menite să explice această comportare. Incidenţa mărită a atopiei la persoane cu deficit de IgA a dus la ideea că deficitul cantitativ sau calitativ al IgA, pe suprafaţa mucoaselor, ar permite o absorbţie excesivă de antigene, care ar stimula sinteza de IgE.

Pe baza unor experimente pe animale, Katz (1980) a formulat o ipoteză diferită. El consideră că, în mod normal, producerea IgE este menţinută la un nivel scăzut, printr-un *mecanism de atenuare* sau de ***inhibare*** („Damping mechanism"), care reflectă echilibrul dintre factorii de reglare supresori şi activatori (fig. 283). Invers, sinteza IgE este stimulată ori de cîte ori activitatea acestui mecanism este diminuată sau supresată. Dacă expunerea organismului la alergene coincide cu o perioadă în care capacitatea individuală de atenuare a sintezei de IgE este perturbată şi diminuată sub o anumită limită, sinteza excedentară de IgE

determină depășirea limitelor normale și atingerea unor concentrații care permit declanșarea stării de hipersensibilitate și apariția simptomelor atopiei. Ipoteza este cunoscută sub denumirea de *străpungerea alergică* („Allergic breakthrough", termenul respectiv sugerînd în limba engleză „un efect realizat prin forță, față de stare de rezistență prealabilă"). Se

Fig. 283. — Mecanismul posibil al „străpungerii alergice". Schema arată că o coincidență între sensibilizare și perturbarea mecanismului normal de inhibare determină „străpungerea alergică" (după Katz și colab., 1979).

adaugă, în mod evident, predispoziția genetică a organismului de a răspunde la antigenele respective și, adesea, influența unor infecții virale concomitente. Existența acestora, mai ales a infecțiilor căilor respiratorii superioare cu Paramyxovirus și cu virusul respirator sincițial reprezintă, după Haenney (1984), una din cauzele obișnuite de afectare selectivă a celulelor T_S, care perturbă funcționarea normală a mecanismului ce moderează sinteza IgE. În acest sens pledează observațiile care au demonstrat că iradierea cu doze mici, tratarea cu ser antilimfocitar sau cu ciclofosfamidă, ca și infecțiile virale, care deprimă activitatea celulelor T, și în special a celulelor T_S, scad funcția acestui mecanism. Adăugarea de celule T_S readuce concentrația IgE sub concentrația-prag alergenică.

Antigenele capabile să inducă o stare de hipersensibilitate imediată, cunoscute în special sub denumirea de *alergene* sau *reactogene* sînt, în general, substanțe netoxice și neimplicate în infecțiozitatea agenților patogeni. Pentru desemnarea antigenelor active în formele spontane de hipersensibilitate s-a propus menținerea noțiunii de *alergene* sau utilizarea denumirii de *atopene*, rezervînd termenul de *anafilactogene* pentru substanțele cu rol în hipersensibilitatea indusă (anafilaxie). Este evident că nu toate antigenele sînt alergene. De asemenea, calitatea de alergen nu se manifestă la orice specie animală. Foarte diferite din punct de vedere chimic, alergenele au g.m. $\sim$30 000 dal. Substanțele cu g.m. foarte mare nu pot străbate mucoasele pentru a se combina cu IgE fixate pe mastocite. Cele cu dimensiuni foarte mici (haptene) pot deveni alergene, după legare de proteinele organismului-gazdă.

Pătrunderea lor în organism se poate face pe mai multe căi:

1) *prin inhalare*, în cazul polenului, deșeurilor de păr, penelor, bumbacului, prafului din locuințe contaminat cu dejecțiile acarianului *Dermatophagoides pterionyssinus* (care se hrănește cu epiteliile descuamate) etc.;

2) *prin ingestie*, în cazul proteinelor alimentare din lapte, ouă, pește, crustacee, fibre vegetale și lectinele din fructe (fragi, căpșuni etc.);

3) *per cutanat*, în cazul veninurilor de insecte, coloranților de anilină etc. Se adaugă diferite proteine heterologe și seruri imune introduse parenteral, precum și o gamă largă de medicamente (peniciline, streptomicină, kanamicină, eritromicină, sulfamide, vitamine, anestezice, barbiturice, tranchilizante, substanțe de contrast pe bază de iod sau sulfobromftaleină etc.).

Din această enumerare selectivă rezultă că unele alergene (proteinele heterologe) sînt puternic imunogene, altele slab imunogene (polenul), iar altele complet neimunogene *per se* (ca, de exemplu, produșii rezultați din degradarea penicilinelor, care devin alergene, după fixarea pe proteinele organismului, cărora le modifică specificitatea).

Anticorpii. Imunoglobulinele capabile să sensibilizeze țesuturile și să declanșeze reacții anafilactice au fost evidențiate la toate mamiferele studiate și descrise sub denumiri diferite ca : *reagine, anticorpi sensibilizanți, anafilactici, alergici sau sensibilizanți ai mastocitelor.* Benacerraf (1963) i-a încadrat în categoria *anticorpilor citotropi*, capabili să se lege de celule. Legarea este condiționată de prezența pe suprafața membranelor celulare a receptorilor pentru regiunea Fc a Ig. Reacțiile de hipersensibilitate imediată, determinate de acest tip de anticorpi, au fost descrise sub denumirea de *anafilaxie citotropă.* Binaghi (1973) critică denumirea de anticorpi citotropi deoarece, după el, nu exprimă o proprietate specifică, ci un mecanism de acțiune și preferă denumirea de *anticorpi anafilactici*, care nu se pretează la nici o confuzie.

Benacerraf și colab. (1963), precum și White, Jenkins și Wilkinson (1963) au demonstrat existența la cobaii hiperimunizați cu DNP a două populații de IgG, cu aceeași specificitate, dar cu mobilitate electroforetică și proprietăți biologice diferite. Populația de anticorpi cu capacitate de migrare rapidă, numită IgG1, sensibilizează pasiv cobaiul, în timp ce IgG2, cu migrare mai lentă, incapabilă să sensibilizeze cobaiul, este activă la șoarece. Aceste date demonstrează existența a două categorii de anticorpi anafilactici, homocitotropi și respectiv heterocitotropi.

Anticorpii homocitotropi sînt capabili să sensibilizeze celulele speciei care i-a produs. Ei se leagă de celulele acesteia sau de unele celule strîns înrudite, dar niciodată de celulele unor specii îndepărtate din punct de vedere sistematic. Aparțin la două tipuri diferite :

Tipul I include anticorpi prezenți în ser în concentrații mari, rezistenți la inactivarea termică la 56°C și la inactivarea cu 2-mercaptoetanol, urmată de alkilare. Au constanta de sedimentare 7S și sînt transmiși transplacentar, de la mamă la făt. Transferați pasiv, acționează după o perioadă scurtă de sensibilizare (2—4 ore) și de asemenea persistă puțin după legarea de celule (6—24 de ore, după Binaghi, 1973 ; 24—72 ore, după Mota, 1986).

La om, anticorpii homocitotropi de tip I aparțin, după Shakib (1980), precum și după Halpern (1980), subclasei de IgG4 sau, cel puțin, unui anumit subgrup, care poartă determinanți de IgG4. Ei au fost descriși, datorită particularităților lor, și sub denumirea de *anticorpi sensibilizanți pentru o perioadă scurtă* („Short-time sensiting") și notați

cu acronimul IgG—S—ST. Anticorpii de acest tip au fost descrişi numai la om, cîine, cobai, şoarece, şobolan, iepure şi la *Peromyscus* („Deer mouse"). Cei descrişi la cobai şi la şobolan sînt consideraţi ca subclase de IgG şi ca atare denumiţi IgG1 şi respectiv IgG2, dar Binaghi (1973) preferă, din mai multe considerente, menţinerea denumirilor iniţiale de $\gamma1$ şi respectiv $\gamma2$.

Tipul II de anticorpi homocitotropi este reprezentat de anticorpi prezenţi în ser doar în cantitate mică. Ei sînt distruşi prin încălzire la 56°C şi sub influenţa mercaptoetanolului. Transferaţi pasiv, sensibilizează după 24 de ore (Binaghi, 1973), respectiv după 48—72 de ore (după Mota, 1986) şi persistă în piele o perioadă îndelungată (> 30 de zile). Nu trec prin placentă. Concentraţia lor creşte în cursul stărilor alergice şi în parazitoze. Aparţin izotipului IgE şi au fost evidenţiaţi la om, şoarece, şobolan, iepure, cobai. Probabil că sînt prezenţi şi la alte specii (tabelul nr. 70).

Tabelul nr. 70

Proprietăţile comparative ale anticorpilor homocitotropi, de tip IgE şi IgG1 (după Binaghi, 1973)

	IgE	IgG1 ($\gamma1$)
Speciile animale →	Om, maimuţă, cîine, şobolan, iepure, cobai, şoarece, oaie	Cobai, şoarece
Mobilitatea electroforetică	Rapidă	Lentă
Greutatea moleculară	200 000 dal	155 000 dal
Conţinutul în glucide	11,7%	1%
Termolabilitatea la 56°C	Labilă	Stabilă
Sensibilitatea la 2-mercapto-etanol	Da	Nu
Concentraţia în ser după hiperimunizare	µg/ml	mg/ml
Incubaţia în sensibilizarea pasivă	24 ore	1—3 ore
Persistenţa în piele	Mai multe zile	6—24 ore
Fixarea pe mastocite şi/sau bazofile	Da	Nu
Fixarea complementului	Nu	Nu
Transferul prin placentă	Nu	Da

Anticorpii heterocitotropi sînt incapabili să sensibilizeze celulele speciei care i-a produs, dar se fixează pe celulele unor specii diferite din punct de vedere sistematic, determinînd numai la acestea reacţii de tip anafilactic. Sînt anticorpi rezistenţi la încălzire la 56°C şi la tratarea cu mercaptoetanol.

Cei de la om aparţin subclaselor IgG1, IgG3 şi IgG4. Ei nu se leagă de mastocitele umane, dar sensibilizează pe cele ale unor specii îndepărtate filogenetic, cum este, spre exemplu, cobaiul (tabelul nr. 71). După Frick (1984), ocazional, funcţia de anticorpi heterocitotropi poate fi înde-

plinită și de IgM sau de IgA. Modul de acțiune al anticorpilor heterocitotropi nu este încă cunoscut. Ipotetic se consideră că ei ar avea o configurație moleculară care le permite să se adapteze la receptorii celulari ai unor specii diferite de cea în care au fost produși.

Tabelul nr. 71

Tipurile de anticorpi anafilactici

Organismele	Tipul de anticorpi	Caracteristicile
Om	Homocitotrop	tip IgG(IgG4) Ig—S—TS
		tip IgE
	Heterocitotrop	IgG1, IgG3, IgG4
Șoarece, șobolan, cobai etc.	Homocitotrop	tip Gama 1, IgG1 la șoarece; IgG1a și IgG1b la cobai, IgGa la șobolan
		tip IgE (asemănători celor de la om)
	Heterocitotrop	tip Gama 2

Rolul imunoglobulinelor E

Descrisă inițial ca o substanță serică termolabilă — *reagina* — capabilă să producă sensibilizarea cutanată pasivă, IgE a fost identificată de Ishizaka (1966) și studiată, cu un deosebit interes, după ce s-a demonstrat rolul său de mediator al bolilor atopice și al anafilaxiei.

Proprietatea biologică esențială a IgE este citotropismul, datorită căruia interacționează cu celulele-țintă, cu mastocitele și cu bazofilele, fixîndu-se pe receptorii corespunzători, RFc ε.

Sinteza IgE este un fenomen localizat în regiunea de intrare a antigenelor în organism, fapt care sugerează un rol important în protecția gazdei față de substanțele străine care o pot invada. Ca urmare, este efectuată, în special, de plasmocitele situate în număr mare în mucoasele bronhiilor, gastrointestinale, ale vezicii urinare, în vegetațiile adenoide și în amigdale. Antigenele care induc sinteza IgE diferă de cele care determină sinteza altor clase de Ig. Astfel, antigenele din nematode, spre exemplu, induc formarea unor cantități mari de IgE, în timp ce antigenele virale și bacteriene induc sinteza de IgG și IgM. Sinteza IgE este dependentă de celulele T_{H} și timectomia neonatală scade total capacitatea organismului de a produce IgE sub influența unor antigene adecvate. IgE produse local sensibilizează mastocitele din vecinătatea lor iar excedentul trece în circulație, unde sensibilizează bazofilele circulante și, final, mastocitele tisulare din întreg organismul.

Legarea lor de receptorii Fcε pare să le protejeze în mare măsură de degradarea catabolică: IgE libere au timpul de înjumătățire T 1/2 de 2 1/2 zile, în timp ce cele legate persistă îndelungat (la om ∼12 săptămîni).

Concentrația IgE prezintă variații mari, ceea ce face ca un nivel seric scăzut să nu excludă etiologia alergică, după cum unii indivizi „normali" pot avea o concentrație de IgE mărită. Nu se formează *in utero*. Titrul mediu crește lent în copilărie, ajunge maximum între 12 și 20 de ani și scade lent după 60 de ani. Crește mult în bolile alergice (astm bronșic, rinita alergică sezonieră etc.), concentrația fiind cu atît mai ridicată cu cît expunerea la alergene este mai îndelungată și bolnavul mai sensibilizat. Crește considerabil în unele parazitoze (ascaridiază, filariază, trichineloză, schitosomiază etc.), în care poate depăși de cîteva mii de ori nivelul normal (250 ng/ml de ser).

Concentrația normală a IgE are valoare predictivă, mai ales la copii, asupra riscului individual, indiferent dacă organismele respective au sau nu simptome de boală.

Controlul genetic al sintezei IgE a fost sugerat de o serie de fapte de observație. Astfel, s-a demonstrat că unele linii pure de șoarece răspund intens la doze mici de antigen și produc chiar un răspuns imun de tip secundar, în timp ce alte linii de animale răspund doar la cantități mari de antigen, producînd tranzitoriu numai cantități mici de IgE, fără a prezenta memorie imunologică. Predispoziția genetică față de bolile atopice, evidentă în unele cazuri, a consolidat această idee : un copil din doi sînt predispuși să se îmbolnăvească dacă ambii părinți sînt alergici, unul din patru, cînd numai un părinte este alergic și numai unul din opt, cînd părinții sînt normali (Haenney, 1984).

Trei categorii de observații pledează pentru implicarea factorilor genetici în alergie :

1) concentrația ridicată în mod normal (de bază) a IgE, observată ca mai frecventă în familiile predispuse la reacții alergice ;

2) hipereactivitatea imunologică, în general, față de orice antigen ;

3) prezența cu frecvență mai mare la persoanele predispuse a anumitor fenotipuri HLA (codificate de genele CMH) ca, de exemplu, HLA-Dw3, HLA-A2, HLA-A3, B7 și HLA-B8. A fost, de asemenea, identificată la om o genă care predispune la un răspuns alergic față de polenul de *Ambrosia*. Analiza segregării genelor în două familii mari, cu incidență crescută de atopie, sugerează moștenirea autosomală a alergiei sezoniere față de *Ambrosia*, datorită unui locus genetic legat de complexul HLA.

Reglarea sintezei de IgE. Producerea de IgE este dependentă de celulele T și implică interacțiunea dintre celulele care prezintă antigenul cu celulele T_H și limfocitele B-IgE. De aceea, sinteza IgE este absentă la șoarecele „nud". Pe de altă parte, antigenele timoindependente nu sînt capabile să inducă sinteza de IgE.

Cercetările efectuate pe animale de laborator au arătat că reglarea sintezei IgE se face prin mecanisme diferite de cea a IgM sau IgG și este mult mai sensibilă în comparație cu acestea (Michael și Bernstein, 1973). S-a demonstrat, de asemenea, că limfocitele T_H și T_S, care reglează sinteza de IgE, sînt distincte de cele care influențează producerea de IgG și pot fi identificate datorită prezenței receptorului pentru regiunea Fc a IgE (RFc∈) pe suprafața lor (Yodoi și colab., 1981 ; Kishimoto și Suemura, 1985). Reglarea sintezei de IgE este mediată de o serie de-

interacțiuni celulare și moleculare, care implică exprimarea RFc∈ pe suprafața celulelor limfoide. Inducția exprimării RFc∈ pe limfocite este supusă unui mecanism complex de modulare prin factori solubili supresori („Suppressive factors of allergy") sau stimulatori („Enhancing factors of allergy") (Marcelletti și Katz, 1984). Acești factori ar fi identici cu cei descriși anterior, sub denumirea de factori stimulatori („IgE soluble enhancing factor") și respectiv supresori („IgE soluble suppressor factor") (Ishizuka, 1985). Valcurone și Tassi (1985) propun ca mai adecvate denumirile de *molecule efectoare stimulatoare* (EEM – „Enhancing effector molecules") și respectiv supresoare (SEM – „Suppressive effector molecules"). În mod normal, numai o mică parte din limfocite exprimă RFc∈ și doar într-un număr foarte limitat. Amplificarea exprimării este determinată fie de interacțiunea directă a limfocitelor cu IgE, fie indirect, prin eliberarea de factori solubili.

Limfocitele expuse unor concentrații mari de IgE eliberează cantități importante de factori reglatori („Ig induced regulants"), care monitorizează exprimarea RFc∈ pe suprafața lor. Studiile pe animale de laborator au demonstrat existența a două tipuri de factori de legare cu afinitate pentru IgE : unii pot amplifica răspunsul IgE, iar alții îl supresează. Diferența majoră dintre ei rezidă în compoziția chimică diferită a componentei lor glucidice. S-a demonstrat, de asemenea, că natura și activitatea factorilor de legare pentru IgE sînt determinate de doi factori produși de celulele T, și anume : factorul de stimulare a glicozilării (GEF – „Glycosilation enhancing factor") și factorul de inhibare a glicozilării (GIF – „Glycosilation inhibiting factor").

Factorul de stimulare a glicozilării (GEF) este o enzimă similară kalikreinei, care stimulează asamblarea oligoglicozidelor din structura factorilor de legare a IgE, în cursul biosintezei lor și, în felul acesta, favorizează producerea factorilor care potențează sinteza de IgE (Ricci del Prete, 1985).

Factorul de inhibare a glicozilării (GIF) este fragment din lipomodulina fosforilată (proteina inhibitoare a fosfolipazei), care, după fosforilare, inhibă procesul de glicozilare.

Cele două tipuri de factori, GEF și GIF, competiționează în cursul formării factorilor de legare a IgE, reglînd ritmul de exprimare a receptorilor de Fc∈. Raportul dintre GEF și GIF în apropierea celulelor T, care poartă RFc∈, va determina natura factorului de legare format, iar factorul format va stimula sau, după caz, va supresa sinteza de IgE.

Celulele implicate în reacțiile de hipersensibilitate

Lezarea alergică a țesuturilor implică, de regulă, participarea activă a mai multor categorii de celule circulante sau tisulare ca : mastocitele, bazofilele, eozinofilele, monocitele, macrofagele, neutrofilele și plachetele, fără a exclude intervenția limfocitelor. Reacțiile de hipersensibilitate apar ca un proces dinamic, în care compoziția celulară globală se modifică în mod continuu, deși există, cel mai adesea, un tip celular predo-

minant. Deşi celulele implicate în reacţiile alergice diferă prin morfologie, natura stimulilor care le activează, conţinutul în mediatori etc., au cîteva caracteristici comune:

1) cu excepţia mastocitelor, au originea în precursori comuni sau cel puţin strîns înrudiţi din măduva oaselor;

2) proliferarea, maturarea, migrarea sau funcţia celor mai multe sînt controlate, cel puţin parţial, de limfocitele T şi mai puţin de celulele B;

3) poartă receptori comuni sau strîns înrudiţi pentru Ig, complement şi o varietate de stimuli de suprafaţă, ce acţionează ca structuri de recunoaştere pe suprafaţa lor;

4) suferă modificări rapide ale potenţialului de membrană;

5) produc metaboliţi ai acidului arahidonic, enzime active pe sistemul complement şi sistemele de coagulare, mediatori sau chemotaxine, care pot acţiona ca mecanisme de activare, de comunicare intercelulară şi de reactivitate vasculară alterată;

6) conţin enzime hidrolitice capabile să acţioneze *în* sau *în afara* celulelor, pentru a îndepărta resturile tisulare sau de microorganisme (Parker, 1984).

Celulele-ţintă cele mai favorizate pentru a acţiona în reacţiile de hipersensibilitate sînt mastocitele şi bazofilele. Ele poartă receptori $Fc\varepsilon$, cu rol fundamental în inducerea reacţiilor alergice şi în apariţia reacţiilor de hipersensibilitate cu evoluţie rapidă, determinate de mediatori cu efecte ca: vasodilataţie, permeabilitate vasculară crescută, edem, contracţia muşchilor netezi etc.

Mastocitele

Sînt celule bazofile (datorită conţinutului ridicat de proteoglicani acizi), care conţin $\sim$1 000 granulaţii colorabile metacromatic, ce umplu complet citoplasma, mascînd prezenţa nucleului. Granulaţiile sînt un fel de vezicule, care stochează cantităţi importante de mediatori, cu rol esenţial în reacţiile de hipersensibilitate şi inflamatorii.

Au fost descrise două tipuri de mastocite, diferite structural, biochimic şi funcţional:

1) **Mastocitele tipice** din ţesutul conjunctiv, localizate, în special, în apropierea vaselor sanguine, celule sesile pe vasele sanguine şi limfatice şi pe conjunctiv. Sînt celule cu morfologie variabilă mai ales sub raportul numărului, mărimii şi intensităţii de colorare a granulaţiilor. Au $\geqslant$20 μm şi conţin numeroase granulaţii cu conţinut ridicat de histamină (15 pg/celulă).

2) **Mastocitele din membrane** sînt celule cu dimensiuni mai mici, care au un conţinut redus de histamină ($<$ 2 pg/celulă). Sînt răspîndite în lamina propria şi în submucoasa stomacului distal, duodenului, jejunului şi, mai ales, în ileon şi colon, fiind implicate, în special, în infestările parazitare şi probabil în reacţiile alergice.

Ambele tipuri poartă RFcε pentru IgE, pentru anumite subclase de IgG (diferite după specie), pentru componenții C3b, C5a, C4a și C3a ai sistemului complement și se degranulează după expunere la antigen.

Funcția lor majoră este cea de stocare de granulații, care conțin mediatori biologic activi, iar localizarea în piele (~ 7 000 mastocite/μL) sau în mucoase (~ 20 000/μL), respectiv în zonele expuse mediului intern, are o semnificație strategică : ele formează o barieră sensibilă, la pătrunderea alergenelor, a cărei poziție îi permite să elibereze mediatori, înainte ca acestea să ajungă în țesuturile subiacente, să declanșeze mecanismele de activare și să împiedice stabilirea unor leziuni importante tisulare, în urma contactului cu alergenele (fig. 284).

Considerate inițial drept celule cu capacitate neobișnuită de acumulare de substanțe din mediu (germ. „Mast" = îngrășare), mastocitele ar avea, după Mota (1986), și un rol normal, asociat cu unele funcții nutriționale încă nedefinite, și în plus rolul de celule de pază („Sentinel cell"), așezate strategic pentru a face față unor situații neprevăzute ca „echipamente de urgență" sau de pericol („Emergency kits").

Rolul celulelor T. Maturarea și proliferarea mastocitelor din mucoase este dependentă de influența celulelor T. Efectul este absent la șoarecele „nud". Celulele T produc o limfokină HRF (factorul de eliberare a histaminei „Histamine releasing factor") ,care induce eliberarea de histamină în mod nespecific, independent de eliberarea indusă de IgE în prezența antigenului. Rolul său ar fi de a intensifica nespecific reacțiile de hipersensibilitate întîrziată și de a le modula pe cele de tip imediat. În plus, prin intermediul *factorului T* („T cell factor") specific pentru antigen, celulele T pot „arma" mastocitele, determinîndu-le să elibereze mediatori, în prezența antigenului, pentru scurtă durată (cîteva ore).

Granulocitele bazofile

Acestea reprezintă 0,5–2% din lecucocitele circulante. Se localizează în țesuturi doar în circumstanțe deosebite. Pot fi deosebite de mastocite doar pe microelectronografii, prin structura granulațiilor. Au pe suprafață 30 000–90 000 receptori pentru RFcε, care leagă, în prezența Ca^{2+} și Mg^{2+}, exclusiv sau preferențial, IgE. Sînt foarte bogate în histamină și heparină. În prezența unor cantități mici de antigen, eliberarea mediatorilor are loc fără modificări morfologice evidente, în timp ce eliberarea indusă de doze mari de antigen este invariabil asociată cu leziuni celulare. Bazofilele s-ar degranula parțial în sînge. După unii cercetători, activarea ar avea loc în teritorii extravasculare și ar fi urmată de migrarea înapoi în sînge.

La om și la cobai există atît mastocite, cît și bazofile. Importanța relativă a celor două tipuri de celule nu este cunoscută, deși la om este evident că mastocitul este sursa principală de mediatori ca răspuns la antigenele din mediu. La rozătoare predomină numeric mastocitele, în timp ce bazofilele sînt în număr redus.

Receptorii pentru regiunea Fc a IgE

Mastocitele și bazofilele poartă un set de receptori de suprafață variabil de la o specie animală la alta, care pot include anumite subclase

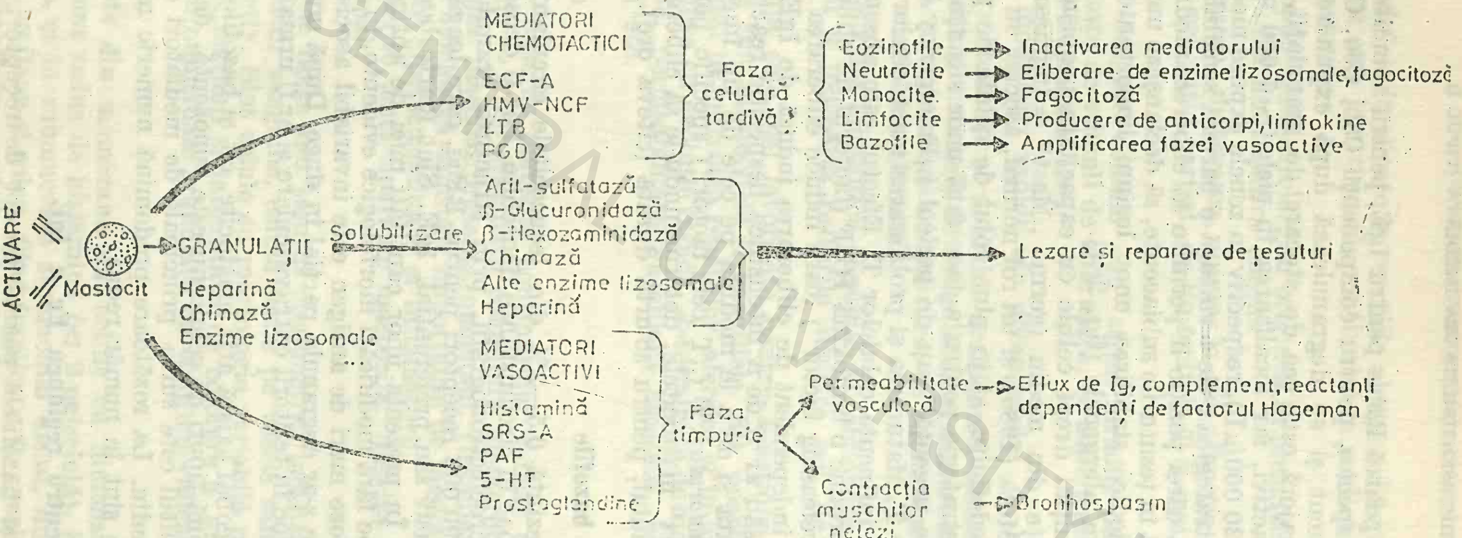


Fig. 284. — Reprezentare schematică a interrelațiilor dintre activarea mastocitelor și fenomenele inflamatorii (după Wasserman și Soter, 1980).

de IgG și receptori pentru componenții C3b, C4a, C5a, C3a ai complementului.

Tipul cel mai important pentru patogenia reacțiilor de hipersensibilitate imediată este *receptorul Fc* al IgE (RIg∊), care leagă IgE prin intermediul regiunii Fc, în așa fel încît regiunile Fab ale anticorpului sînt îndreptate spre micromediul ambiant, pentru a reacționa cu antigenele specifice. Receptorii Fc∊ sînt prezenți la ~1% din celulele T, la ~30% din celulele B și la ~2% din monocite. Numărul lor crește foarte mult în sezonul polenului la bolnavii atopici și în cursul diferitelor boli alergice.

Structura receptorului pentru Ig∊. Receptorii de IgE sînt glicoproteine integrate, care plutesc în membrana plasmatică, putînd fi mobilizate în planul acesteia. Sînt alcătuiți din trei catene polipeptidice, fiecare formată din două domenii (fig. 285).

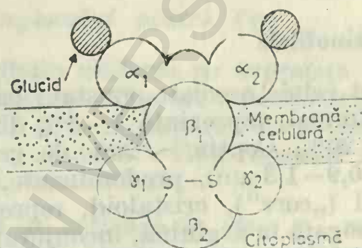


Fig. 285. — Model de structură al receptorului de IgE (modificat după Metzger, 1984).

Domeniile α, care poartă componentele glucidice, sînt parțial expuse pe suprafața membranei și includ situsul de legare al IgE (domeniul α1). Catenele β, parțial localizate în membrană, sînt implicate în transmiterea semnalului de la suprafață în interiorul celulei. Catenele γ, ca și cele β1 sînt intramembranare și expuse parțial în interiorul celulei. Domeniile α și β sînt asociate printr-o structură mai puțin compactă, sensibilă la proteoliză, în timp ce domeniile γ sînt reunite printr-o punte disulfidică.

Numărul receptorilor T pentru Ig∊ este apreciat în limite extrem de largi, probabil, datorită tehnicilor utilizate. După Frick 1984), ar fi de 5 000—27 000 la indivizii nealergici și între 15 000 și 40 000 la alergici. Densitatea lor crește la indivizii cu nivele ridicate de IgE circulante, probabil prin inducția sintezei. Parker (1984) apreciază numărul lor la $10^5 - 5 \times 10^5$, iar alții autori la ~400 pe μm^2 (situați la o distanță de 50 nm unul de altul). La concentrații normale de IgE, majoritatea situsurilor-receptor sînt neocupate, în timp ce la concentrații mari sînt libere numai ~5%.

Plachetele sanguine

Provenite prin fragmentarea citoplasmei megacariocitelor, plachetele sanguine conțin, pe lîngă unele organite (mitocondrii, lizosomi etc.), o serie de granulații de natură necunoscută. Conțin, de asemenea, histamină și serotonină, care nu sînt sintetizate, ci acumulate printr-un mecanism necunoscut, ADP, ATP, epinefrină și enzime lizosomale.

Eliberarea mediatorilor din structura lor nu poate fi realizată prin mecanisme imunologice, deoarece nu au RFc ε. Au fost descrise două mecanisme potenţiale:

1) *Mecanismul direct*, de tip secretor, ar fi determinat de aderenţa complexelor antigen — anticorp sau a agregatelor de Ig, care, datorită modificărilor conformaţionale produse în regiunile Fc ale anticorpilor, ar dobîndi capacitatea de a se fixa pe suprafaţa plachetelor. Procesul secretor propriu-zis implică participarea microfilamentelor şi a microtubulilor.

2) *Mecanismul indirect* ar fi dependent de intervenţia factorului PAF, produs şi eliberat din mastocitele şi bazofilele activate de o reacţie antigen — anticorp. Activarea plachetelor, cu rol esenţial în depunerea complexelor antigen — anticorp pe suprafaţa peretelui vascular, necesită Ca^{2+} şi Mg^{2+}, consum de energie şi este influenţată de concentraţia AMPc.

Eozinofilele

Sînt celule asociate constant cu reacţiile alergice şi infestările parazitare. Normal, reprezintă 1—3% din leucocitele circulante, iar la alergici 10—20%. Conţin ~200 de granulaţii caracteristice. Granulaţiile mari (Ø 0,9—1,3 μm), predominante, prezintă pe microelectronografii un corpuscul („core"), cristaloid, reprezentat de proteina bazică majoră (PBM), bogată în arginină, înconjurat de o zonă mai puţin densă. Granulaţiile mici conţin arilsulfatază, histaminază şi fosfatază acidă.

Eozinofilele au pe suprafaţă receptori pentru IgG, IgE şi complement, care pot funcţiona ca situsuri de recunoaştere pentru activarea celulară şi eliberarea conţinutului granulaţiilor. Produc, în mod prelungit, H_2O_2, superoxizi şi prostaglandina PGE2. Eozinofilopoeza este dependentă de limfocitele T. Dovada o constituie faptul că infestările parazitare ale şoarecelui „nud" şi ale animalelor timectomizate la naştere nu sînt urmate de eozinofilie.

Funcţiile eozinofilelor. Deşi ~25% din eozinofilele umane au RFcε şi ca urmare pot fi activate specific, ele nu par a avea rolul de celule-ţintă directe în reacţiile alergice.

Rolul de modulator al reacţiilor alergice. Numeroase fapte de observaţie pledează pentru un rol principal în modularea reacţiilor alergice, de control negativ prin feedback, bazat pe limitarea eliberării mediatorilor şi pe îndepărtarea complexelor antigen — anticorp. Între acestea, cele mai semnificative sînt următoarele:

1) produc arilsulfatază, histaminază şi fosfolipază D, care inactivează SRS-A, histamina şi respectiv factorul PAF;

2) neutralizează heparina şi degradează leucotrienele;

3) după activare, produc prostaglandine ce induc creşterea concentraţiei AMPc, care are rolul de a inhiba eliberarea histaminei;

4) înglobează complexele antigen — anticorp (fenomen demonstrat cu complexul feritină — antiferitină), îndepărtîndu-le din circulaţie prin fagocitoză;

5) înglobează granulațiile extrudate din mastocite, împiedicînd eliberarea mediatorilor prezenți în ele.

Rolul citotoxic este al doilea rol major al eozinofilelor, demonstrat prin capacitatea proteinei bazice majore de a omorî larvele de *Schistosama mansoni*, chiar în doze foarte mici (~ 20 μM) (Gleich, 1980), printr-un efect direct, potențat de mastocite. Se consideră că larvele de *S. mansoni* (cercari sau schistosomale), pătrunse prin piele, sînt sensibilizate de acțiunea IgG specifice, care determină activarea sistemului complement. Mastocitele aderă de larvele acoperite de complement (C3 la nivelul RC3) și eliberează factorul chemotactic pentru eozinofile (ECF-A). Acestea atrase se leagă de parazit și exercită un efect puternic antiparazitar prin depunerea locală de PBM și/sau chiar prin injectarea conținutului granulațiilor în citoplasma parazitului (Smith, 1981).

Activarea mastocitelor. Rolul receptorului pentru Fcε

În mod normal, RFcε sînt distribuiți uniform pe suprafața mastocitelor și bazofilelor. Activarea celulelor și eliberarea mediatorilor sînt condiționate de modificarea distribuției și de regruparea lor pe suprafața acestora, pentru a forma „petice" sau „bonete". Experimental au fost demonstrate următoarele posibilități de realizare :

1) Mecanismul cel mai probabil de activare *in vivo* se realizeză prin legarea de către antigenul respectiv, bivalent sau multivalent, a două molecule de IgE specifice, care sînt fixate de celule prin regiunea lor Fc. Se realizează astfel o interconectare („Crosslinking"), care stabilește o „punte" între două molecule de IgE adiacente (fig. 286). După Wells (1984), pentru inițierea activării, legarea a mult mai puțin de 100 de molecule de IgE este suficientă. Fenomenul este urmat de regruparea IgE, care antrenează RFcε, ducînd la formarea de grămezi de IgE, legate de receptori, la un pol al celulei („capping") (Morrison și Henson, 1978). El este posibil datorită legării solide a IgE de RFcε, afinității ligandului pentru IgE și mobilității receptorilor în planul membranei. Perturbarea produsă de regruparea RFcε constituie prima etapă a activării mastocitelor, semnalul de activare fiind dat de o modificare conformațională a IgE. Ea nu poate fi realizată de antigenele monovalente pentru că acestea nu pot interconecta două molecule de IgE adiacente pe mastocit (fig. 287).

2) Activarea determinată de anticorpii anti-Fc ai IgE, care recunosc determinanții izotipici ai acestora.

3) Activarea cu ajutorul anticorpilor antiidiotipici, care recunosc idiotopii localizați în regiunea Fab a IgE (fig. 287).

4) Activarea produsă de anticorpii antireceptor Fcε, care se fixează direct pe suprafața acestora.

5) Activarea prin intermediul dimerilor bivalenți de IgE, obținuți experimental prin tratarea cu agenți chimici polimerizanți.

6) Activarea prin tratare cu fragmente $F(ab)'_2$ bivalente derivate din anticorpi antireceptor.

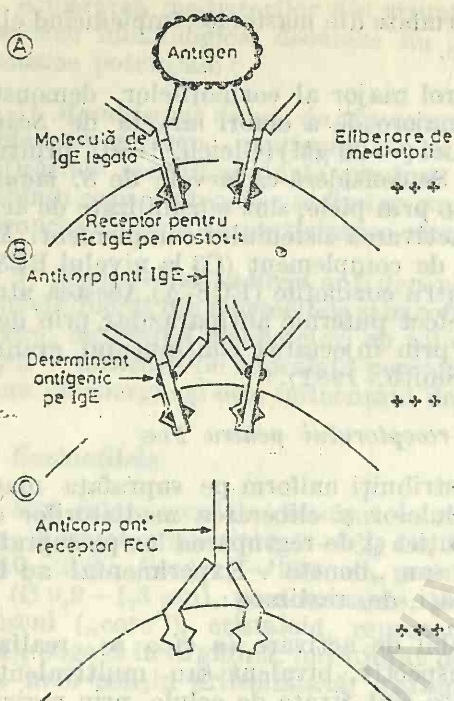


Fig. 286. — Eliberarea mediatorilor farmacologic activi din mastocite și bazofile se poate face nu numai prin legarea antigenului specific (A), ci și prin intermediul anticorpilor anti-IgE (B) și prin anticorpi antireceptor Fc(C) (după Haeney, 1984).

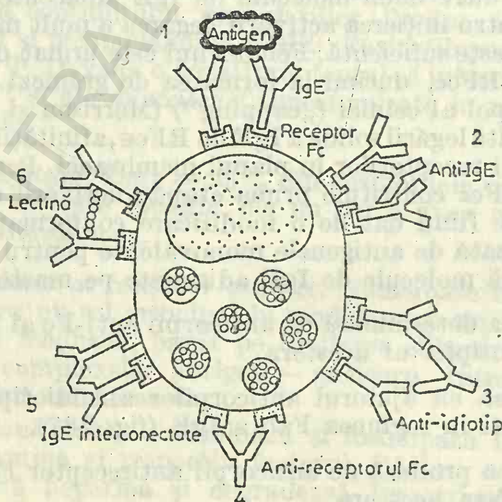


Fig. 287. — Activarea mastocitelor prin intermediul receptorilor Fcε (Rcε), care pot fi interconectați prin : 1 — legarea antigenului de moleculele de IgE specifice fixate pe Fcε ; 2 — anticorpi bivalenți care recunosc determinanții izotipici ai regiunii Fc a IgE ; 3 — anticorpi anti-idiotip ce recunosc idiotopii regiunii Fab a IgE ; 4 — anticorpii antireceptor fixați direct pe RFcε ; 5 — dimeri bivalenți de IgE obținuți experimental cu agenți chimici polimerizanți ; 6 — lectine (după Roitt, Brostoff și Male, 1985).

7) Activarea cu fragmente Fab′ de anticorpi antireceptor și IgG de iepure.

8) Activarea cu ajutorul lectinelor multivalente (PHA, ConA, ricin etc.) capabile să se lege de resturile glucidice ale IgE (fenomenul ar putea explica alergia la unele fructe (fragi, căpșuni etc.), care conțin lectine.

9) Activarea neimunologică a fost produsă cu o gamă largă de produși naturali sau de sinteză, ca anafilatoxinele (C3a, C5a), melitina (din veninul de albine), ionoforii pentru calciu, compusul secretagog 48/80 (produs de condensare a p-metoxifenetil metilamina cu formaldehida), o serie de medicamente (morfina, codeina, ACTH sintetic etc.) (fig. 288). Ei au proprietatea comună de a induce intrarea Ca^{2+} în celulă și de a declanșa fenomenele biochimice ce determină degranularea și eliberarea mediatorilor.

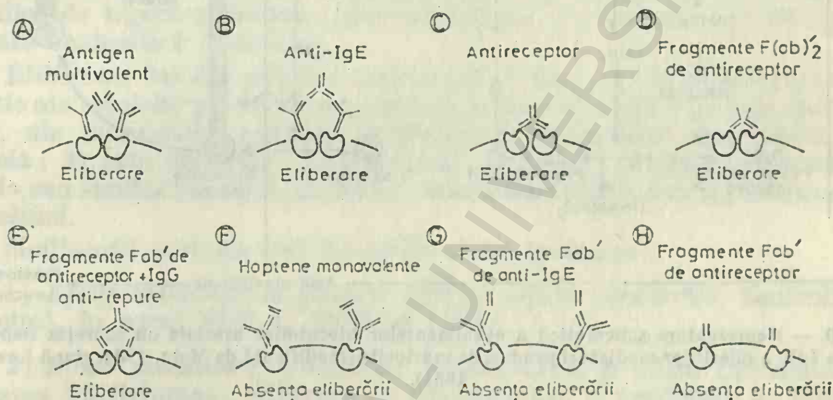


Fig. 288. — Reprezentare schematică a rolului IgE și receptorului IgE în eliberarea mediatorilor din mastocite și bazofile (după Kulczycki Jr., 1981). Eliberarea mediatorilor este inițiată de antigenele bi- sau multivalente (A), de anticorpii anti-IgE (B), de anticorpii antireceptor IgE (C), de fragmentele bivalente $(Fab)_2$ ale anticorpilor antireceptor (D), ca și de fragmentele Fab de antireceptor plus IgG antiiepure (E). Eliberarea mediatorilor nu are loc în prezența haptenelor monovalente (F), a fragmentelor Fab′ monovalente ale anti-IgE (G) și a fragmentelor Fab′ monovalente ale anticorpilor antireceptor de la iepure (H).

Modificări biochimice asociate cu activarea mastocitelor. Agregarea receptorilor și imobilizarea lor într-o regiune limitată în planul membranei celulare declanșează un semnal membranar, în inițierea căruia un rol important l-ar avea distorsionarea fizică a IgE de către antigen. Repercusiunea directă este activarea proserin-esterazei și declanșarea unei „cascade" de reacții biochimice, la capătul căreia se produc degranularea și eliberarea mediatorilor. În acest proces, rolul IgE este considerat a fi pur pasiv, de a asigura, prin dimerizarea lor, agregarea receptorilor. Acest rol este totuși fundamental, deoarece IgE servesc ca un adevărat transductor al activării, cu rol determinant în modularea răspunsului celular, fie în sens pozitiv, fie în sens negativ (Metzger, 1978).

În prima etapă a modificărilor biochimice, serin-esteraza activată convertește fosfatidilcholina la fosfatidiletanolamină, care suferă o dublă metilare : 1) prima, prin acțiunea metiltransferazei I, localizată pe partea

citoplasmatică a membranei celulare, cu formare de fosfatidil-N-monometiletanolamină, iar a doua, prin acţiunea metiltransferazei II, la fosfatidilcholină. Aceste modificări sînt asociate cu deplasarea fosfolipidelor de pe faţa citoplasmatică spre faţa externă a membranei, cu mărirea fluidităţii acesteia şi cu producerea tranzitorie a unor canale, prin care Ca^{2+} pătrund în celulă (fig. 289).

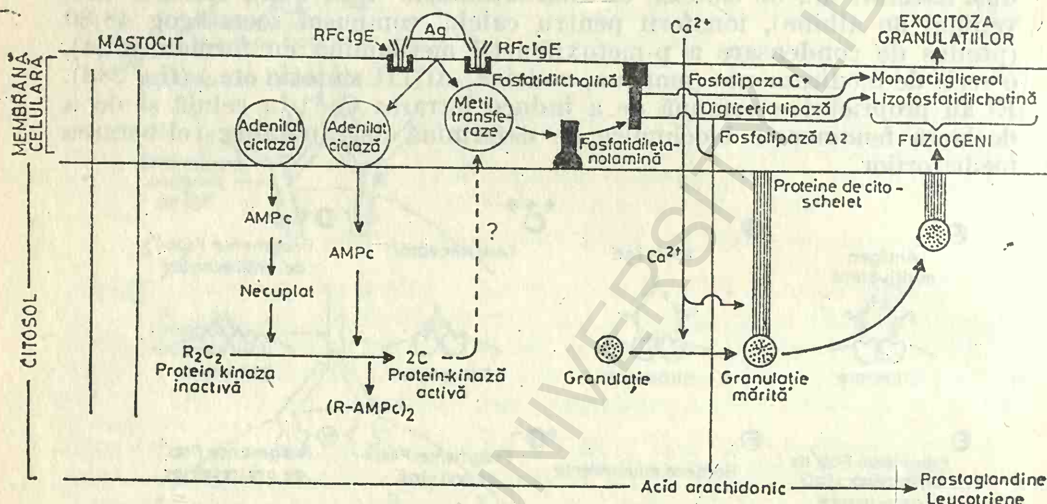


Fig. 289. — Reprezentare schematică a evenimentelor biochimice asociate cu secreţia dependentă de IgE a diferiţilor mediatori produşi de mastocite (modificată de Mota, 1984, după Lewis, 1981).

Creşterea concentraţiei Ca^{2+} în celulă activează fosfolipaza A_2, care degradează fosfatidilcholina la lizofosfatidilcholină şi acid arahidonic, produs-cheie, cu rol esenţial în formarea *de novo* a unor mediatori esenţiali (prostaglandine şi leucotriene). Ca^{2+} activează, totodată, fosfolipaza C, care acţionează pe fosfolipidele membranare, producînd diacilglicerol. Acesta este convertit de diglicerid-lipază la monoacilglicerol şi o serie de acizi graşi între care acidul arahidonic. Unii din produşii acestor reacţii finale (lizofosfatidilcholina, monoacieglicerolul şi diacilglicerolul) sînt puternic fuziogeni. Ei favorizează fuziunea membranelor perigranulare de membrana citoplasmatică, etapă premergătoare, esenţială, fenomenului de secreţie a mediatorilor în mediul extern.

Semnificaţia funcţională a modificărilor biochimice. Creşterea concentraţiei Ca^{2+} este intim legată de fenomenul degranulării. În mod normal, concentraţia Ca^{2+} în citoplasmă este de aproximativ o mie de ori mai mică decît în mitocondrii, în reticulul endoplasmatic sau în mediul extern. În activitatea Ca^{2+}, un rol esenţial îl are *calmodulina,* proteină ubicvitară de legare a Ca, care modulează cele mai multe procese mediate de aceşti ioni (Way Yiu Cheung, 1982). Ea funcţioneză ca un receptor intracelular major pentru Ca^{2+}, de care este activată alosteric, în urma unor modificări conformaţionale importante. Complexul Ca^{2+} — calmodulină joacă

rolul unui al doilea mesager, acţionînd ca un regulator multifuncţional pentru o serie de enzime (AMP-fosfodiesteraza, adenilat ciclaza, fosfolipaza A_2, fosforilkinaze), pentru asamblarea şi dezasamblarea microtubulilor, pentru eliberarea histaminei, a SRS-A şi în modularea concentraţiei AMPc. Fosforilarea proteinelor este răspunzătoare de modificările de permeabilitate a membranei perigranulare, ca şi de contracţia microfilamentelor, care dirijează deplasarea granulaţiilor spre periferia celulelor.

Mediatorii anafilaxiei

Sînt substanţe biologic active eliberate, direct sau indirect, ca rezultat al reacţiilor antigen — anticorp, răspunzătoare de diferitele manifestări ale hipersensibilităţii imediate. Unii mediatori sînt preformaţi (histamina, serotonina, heparina etc.), alţii se formează în cursul reacţiilor de hipersensibilitate (prostaglandine, leucotriene), iar alţii prin activare enzimatică (kininele).

Eliberarea lor din celule se realizează pe trei căi : 1) prin leziuni de tip litic ale celulelor producătoare ; 2) prin leziuni citotoxice induse, ireversibile, ale membranei celulare şi pierderea controlului permeabilităţii acesteia ; 3) prin eliberare „anafilactică", respectiv printr-un mecanism identic sau similar secreţiei, de trecere selectivă a mediatorilor, fără moartea celulei.

Mediatorii exercită trei tipuri de efecte biologice :

1) *Efecte chimiotactice* pentru diferite celule (eozinofile, neutrofile, limfocite), în cazul ECF-A, NCF şi LTB4.

2) *Efecte activatoare* urmate de vasodilataţie şi edem (histamină), activarea C3 (triptaza), eliberare de kininogenaze şi producere de kinine cu rol în inflamaţie.

3) *Efecte spasmogene*, prin contracţia muşchilor netezi bronhici, obstrucţie bronhică, producere de mucus şi edem mucos, în cazul prostaglandinei PG2 şi a LTC4 şi LTD4.

Diferitele populaţii de mastocite pot produce mediatori diferiţi. Polimorfismul clinic manifestat prin afectarea diferitelor organe, depinde de prezenţa şi/sau frecvenţa mastocitelor aparţinînd diferitelor populaţii.

Mediatorii preformaţi

Histamina (g.m. 111 dal) provine din decarboxilarea histidinei şi este asociată în mastocite cu heparina. Mediatorul activ major al eliberării sale din celule ar fi complementul, respectiv anafilatoxinele (C3a şi C5a), care se fixează pe membrana mastocitului.

Histamina are efect vasodilatator, măreşte permeabilitatea capilară, facilitează trecerea de plasmă în spaţiile interstiţiale şi producerea de edem. Exercită un efect de stază capilară marcată, favorizînd „umplerea" cu sînge (prin relaxarea tonusului) a arteriolelor şi diminuarea „scurgerii" prin contractarea venulelor aferente. Creşterea marcată a permeabilităţii vasculare nu este un fenomen pasiv, ci este rezultatul contracţiei active a celulelor endoteliale, care determină formarea de breşe în peretele intern

al vaselor. Şocul histaminic este caracterizat prin hipotensiune, edem, tahicardie, colaps vascular. La om poate induce edemul glotei. Are efect bronhoconstrictor la cobai şi la cîine, şi doar un rol minor la rozătoare.

Serotonina, sau 5-hidroxitriptamina, provine din acţiunea decarboxilazei asupra 5-hidroxitriptofanului. Este prezentă în granulaţiile mastocitelor din mucoasa intestinală, creier şi la unele specii în plachete.

Produce contracţia muşchiului neted şi măreşte permeabilitatea capilară. Este fără efect la cobai.

Heparina este un mucopolizaharid acid, răspunzător de colorarea metacromatică a granulaţiilor mastocitelor şi bazofilelor.

Nu pare să aibă rol în anafilaxie (excepţie, la cîine). Are acţiune anticoagulantă.

Enzimele sînt reprezentate de *triptază* (g.m. 130 000 dal), proteină activatoare a componentului C3, şi de *β-glucozaminidază*, care clivează resturile de glucozamină.

Factorul chemotactic al eozinofilelor (ECF—A— „Eosinophil chemotactic factor of Anaphylaxis" este un tetrapeptid acid, cu g.m. ~ 500 dal).

Induce afluxul eozinofilelor în teritoriul inflamaţiei alergice.

Factorul chemotactic al neutrofilelor (HMW—NCF— „High molecular weight neutrophil chemotactic factor") are g.m.mare (750 000 dal).

Atrage neutrofilele în regiunile afectate, în special, în cursul fenomenelor induse de agenţi fizici (frig sau expunere la soare).

Mediatorii neoformaţi

Sînt reprezentaţi de *prostaglandine*, *leucotriene* şi *tromboxani*. Ei au o origine comună, fiind produşi după lezarea membranei celulare, pe două căi enzimatice, avînd ca punct de plecare acidul arahidonic, format anterior, prin acţiunea fosfolipazei A_2 şi a fosfolipazei C asupra fosfolipidelor din membrana celulară. Procesul este cunoscut sub denumirea de „cascada acidului arahidonic" şi evoluează astfel:

Calea prostaglandinelor, sau de metabolism oxidativ al acidului arahidonic, este iniţiată de transformarea acidului arahidonic la doi endoperoxizi ciclici (PG D2 şi PG H2), care, la rîndul lor, sînt transformaţi de sintetaze la *prostaglandine active* (D_2, E_2, $F_2\ \alpha$, I_2) şi la *tromboxanul* A_2 (fig. 290).

Prostaglandinele (PG) produse de mastocite, bazofile, eozinofile şi probabil de alte celule, măresc, în general, permeabilitatea vasculară şi relaxează muşchii netezi bronhici. Există însă unele diferenţe notabile de acţiune. Astfel, PG2 produsă de mastocitele umane este puternic vasodilatatoare, PGE1 şi PGE2 sînt puternic bronho— şi vasodilatatoare, PGF2α puternic bronhoconstrictoare, iar PGI2 determină dezagregarea plachetelor. Prostaglandinele sînt produse în cantităţi mult mai mari (97 nm/10^6 celule) de mastocitele umane, decît de cele de şoarece (8 ng/10^6 celule), în cazul PGD2.

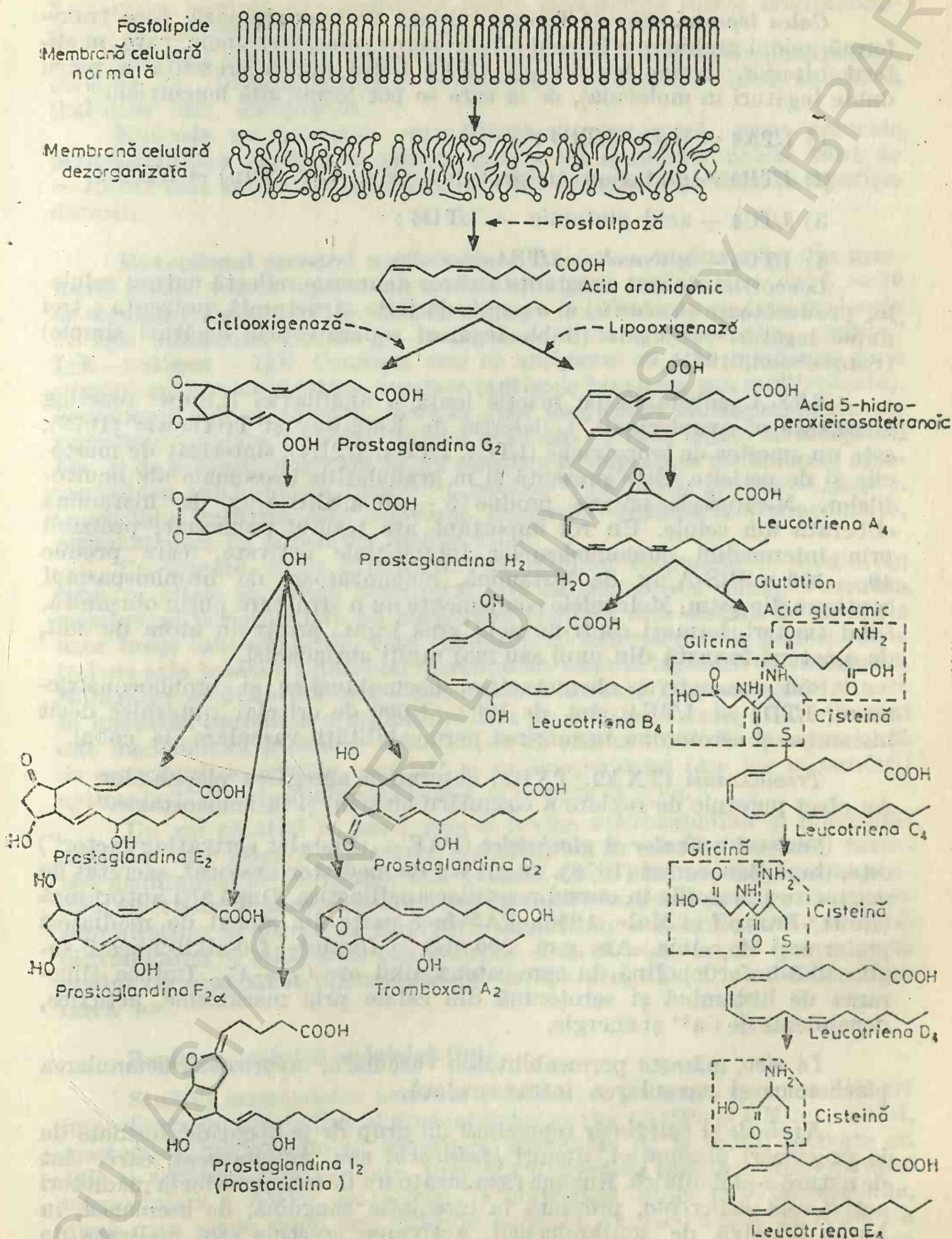


Fig. 290. — Reprezentare schematică a „cascadelor" enzimatice ce duc la formarea prostaglandinelor și leukotrienelor în mastocite și la degranulare, după stimularea receptorilor de IgE prin interacțiunea IgE — alergene. (după Gualde, 1985)

Calea leucotrienelor (LT) este inițiată de lipooxigenază, care transformă acidul arahidonic la acid 5-hidroperoxi-eicozatetranoic, care, modificat ulterior, devine leucotriena LTA4 (cifra indică prezența a patru duble legături în moleculă), de la care se pot forma alte leucotriene :

1) LTA4 + H_2O → LTB4 ;

2) LTB4 + glutation (tripeptidul Gly, Cys, Glu) → LTC4 ;

3) LTC4 + acid glutamic → LTD4 ;

4) LTC4 + glicocol → LTE4.

Leucotrienele sînt substanțe a căror denumire reflectă natura celulelor producătoare (*leucocite*) și o particularitate structurală, prezența a trei duble legături conjugate (duble legături separate prin legături simple) (Samuelsson, 1981).

SRS-A, substanța cu reacție lentă a anafilaxiei („Slow reacting substance of anaphylaxis"), descrisă de Kellaway și Trethewie (1979), este un amestec de leucotriene (LTC4, LTD4, LTE4), sintetizat de mastocite și de pericite. Este prezentă și în granulațiile lizosomale ale neutrofilelor. Mastocitele umane produc 5 — 10 u.SRS-A/μg de histamină eliberată din celule. Un rol important are țesutul pulmonar, probabil prin intermediul mononuclearelor interstițiale activate, care produc 40 — 100 u.SRS-A/μg de histamină, răspunzătoare de bronhospasmul continuu din astm. Moleculele componente au o structură puțin obișnuită, fiind tioeteri formați dintr-un acid gras legat, printr-un atom de sulf, de o catenă formată din unul sau mai mulți aminoacizi.

Sînt vasoactive, chemotactice, chemokinetice și bronhoconstrictoare. LTD4 și LTE4 sînt de 100 — 1 000 de ori mai puternice decît histamina și serotonina în mărirea permeabilității vasculare la cobai.

Tromboxanii (TXA2, TXB2) determină agregarea plachetelor. Au efect puternic de reglare a coagulării sîngelui și în homeostazie.

Factorul activator al plachetelor (PAF— „Platelet activating factor") este, după Benacerraf (1976), un alt tip de mediator nestocat, secretat de mastocite și bazofile în cursul reacțiilor anafilactice. După alți autori însă (Roitt, Brostoff și Male, 1986), PAF face parte din stocul de mediatori preformați în celule. Are g.m. 600 dal și formula 1-0-alkil-2-acetil-sn-glicozil-3-fosforilcholină, în care catena alkil are C_{16} — C_{18}. Induce eliberarea de histamină și serotonină din celule prin mecanisme netoxice, dependente de Ca^{2+} și energie.

In vivo, mărește permeabilitatea vasculară, favorizează acumularea plachetelor și coagularea intravasculară.

Kininele și *kalidinele* reprezintă un grup de polipeptide, formate de la precursori plasmatici, numiți *kininogeni* sau *kalidinogeni*, care sînt de natură α-globulinică. Enzima răspunzătoare de conversia lor la mediatori activi este *kalicreina*, prezentă în circulația sanguină, de asemenea, în forma inactivă de kalikreinogen. Activarea acestuia este realizată de factorul Hageman, de tripsină, de fibrinopeptide și de plasminopeptide.

Kalikreina tisulară din țesuturile lezate transformă direct bradikininogenul în kalidină III.

Cele mai cunoscute kinine sînt bradikinina (kalidina I), nonapeptid, kalidina II (lizilbradikinina), decapeptid, și metionil lizilbradikinina (kalidina III), decapeptid.

Kininele au activitate vasodilatatoare puternică, cresc puternic permeabilitatea capilară și produc contracția mușchilor netezi. Sînt de ~15 ori mai active decît histamina. Bradikinina contribuie la apariția durerii.

Mecanismul secreției mediatorilor. Eliberarea mediatorilor din mastocite începe foarte repede din momentul legării antigenelor (după ~20 de secunde) (Parker, 1984). Practic, legarea unui antigen cu două molecule de IgE adiacente, situate pe membrana celulară, formează o „punte" IgE—antigen — IgE. Condiția este ca antigenul să aibă minimum două situsuri antigenice identice, repetate (antigene bivalente sau multivalente). Fenomenul are ca urmare apariția unor modificări conformaționale ale suprafeței celulare, în cursul cărora molecule de IgE, legate de receptorii Fcε și de antigen, migrează ca un complex pe suprafața membranei, aglomerîndu-se sub formă de „petice" („patches") și final de „bonete" („cap"). Consecința imediată este activarea sistemelor enzimatice intracelulare, răspunzătoare de eliberarea mediatorilor.

Ca urmare, unele granulații sînt complet extrudate în mediu, în timp ce altele își golesc conținutul fără să părăsească celula. Fuziunea membranei perigranulare cu membrana celulară este urmată de apariția unor breșe sau canalicule, care comunică cu exteriorul. Ele măresc de ~ trei ori aria totală a suprafeței membranare expusă legăturii cu exteriorul. Eliberarea mediatorilor este segmentară și limitată la granulațiile situate în imediata apropiere a stimulului. Ea nu continuă decît dacă stimulul este menținut ca și cum ar fi nevoie de un stimul tonic. Este dependentă de consumul de energie, de Ca^{2+} și de temperatură (are loc în condiții optime la 37°C, este diminuată la 20°C și stopată la 4°C).

Un rol esențial în acest proces revine microtubulilor și microfilamentelor care asigură deplasarea granulațiilor în celulă, favorizînd fuziunea membranei lor cu membrana celulară, după cum au demonstrat studiile efectuate. Tratarea mastocitelor cu colchicină, care produce disocierea subunităților și pierderea structurii organizate a microtubulilor, inhibă degranularea și eliberarea mediatorilor. Invers, substanțele care măresc gradul de agregare a microtubulilor, ca apa grea ($D_{2}0$), intensifică eliberarea lor.

Reglarea activării celulelor-țintă

Studiul mastocitelor activate a evidențiat prezența unor modificări importante în metabolismul nucleotidelor ciclice (AMPc și GMPc). Astfel, mastocitele peritoneale și bazofilele circulante de la cobai, activate cu IgE și antigene multivalente, prezintă o creștere rapidă a concentrației intracelulare a AMPc. Ea ajunge la maximum după 15 — 20 secunde, după care scade rapid sub valorile normale. Creșterea atît de rapidă a AMPc, precedînd faza de eliberare evidentă a mediatorilor, sugerează

o posibilă implicare a AMPc în fazele timpurii ale inducției secreției acestora, așa cum face, de altfel, în majoritatea celulelor a căror funcție principală este secreția (Sydbon și colab., 1981).

Rolul adenilat ciclazei. În mod normal, AMPc este produs lent, prin acțiunea adenilat ciclazei, enzimă relativ inactivă, legată de membrana celulară. Ea convertește ATP citoplasmatic la AMP (3′, 5′- adenozin monofosfat ciclic). În prezența Ca^{2+} și Mg^{2+}, AMPc controlează activitatea enzimelor celulare și a barierelor de permeabilitate, în mod normal, în sensul stimulării proceselor de sinteză și de secreție celulară. Cînd în sînge este eliberat un hormon, conform concepției lui Sutherland (1970), acesta acționează ca un *mesager primar*, legîndu-se de receptorii specifici de pe membrana celulară, mărind activitatea adenilat ciclazei și, prin aceasta, conversia ATP la AMPc. Acesta acționează ca un mesager secundar („*al doilea mesager*"), inducînd celulele să-și intensifice anumite funcții fiziologice, ca, de exemplu, procesele de sinteză și secreție celulară.

În reacțiile anafilactice, rolul AMPc este însă exact invers celui descris în alte sisteme secretoare. În consecință, creșterea concentrației sale inhibă eliberarea mediatorilor de tipul aminelor vasoactive și determină relaxarea mușchilor netezi bronhici.

Numeroase fapte de observație experimentale sau clinice au demonstrat că severitatea reacțiilor alergice este influențată de „mediatorii" sistemului nervos autonom, care reglează cantitatea substanțelor farmacologic active eliberate din celule-țintă și intensitatea răspunsului celulelor din „organul șoc". Efectele sistemului simpatic (adrenergic) pot fi reproduse cu ajutorul catecolaminelor (amine simpaticomimetice ca, epinefrina, norepinefrina, dopamina și compusul de sinteză izoproterenol). Efectul sistemului parasimpatic este „mimat" de acetilcolină (fig. 291). Cele două sisteme au, în general, efecte opuse asupra diferitelor organe și țesuturi asigurînd astfel homeostazia organismului. Acest fenomen este foarte evident în cazul celulelor mușchilor netezi ai bronhiilor : stimularea lor cu acetilcolină determină contracția, iar cea cu adrenalină, relaxarea. Răspunsul lor, alternativ, la cele două tipuri de stimuli asigură tonusul mușchilor netezi sau homeostazia.

Studiul complex biochimic al activării celulelor-țintă a demonstrat că stimularea receptorilor celulari cu agenți farmacologic activi externi inițiază un lanț de reacții chimice cu efect final intracelular (fig. 292).

Astfel, stimularea *receptorilor α-adrenergici* cu ajutorul noradrenalinei (norepinefrina) diminuă concentrația AMPc și intensifică activitatea sistemelor enzimatice ce determină eliberarea mediatorilor din mastocite. După unii cercetători, receptorul α-adrenergic ar fi reprezentat de ATPază. Ea competiționează, în mod normal, cu adenilat ciclaza pentru ATP, determinînd formarea directă de 5′-AMP inactiv, fără formarea intermediară de AMPc. Stimularea ATPazei de către noradrenalină ar permite folosirea directă a ATP, pentru a forma 5′-AMP inactiv, deturnînd precursorul esențial pentru producerea AMPc.

Receptorii β-adrenergici sînt reprezentați de o enzimă cuplată cu unitatea catalitică a adenilat ciclazei. Stimularea lor cu adrenalină (epinefrină) sau cu izoprenalină determină activarea adenilat ciclazei, creș-

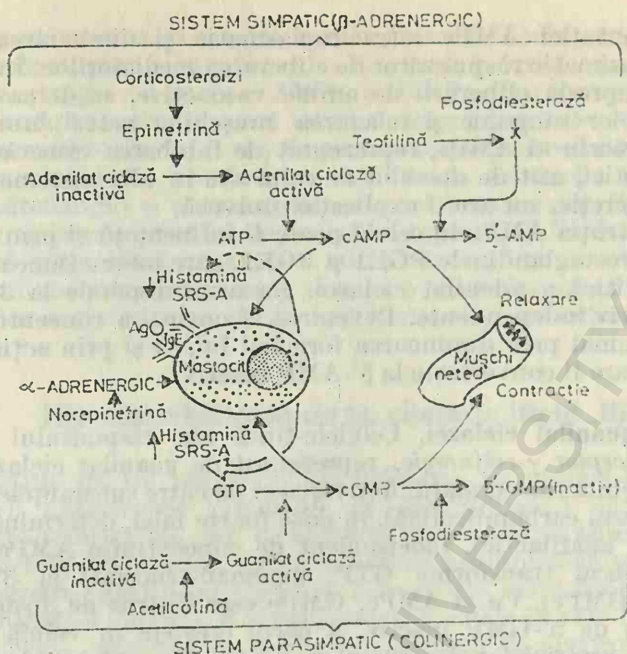


Fig. 291. — Influența sistemului nervos autonom asupra severității reacțiilor alergice, cu menționarea mediatorilor farmacologic activi ce reproduc efectele sistemului simpatic și parasimpatic (după Frick, 1984).

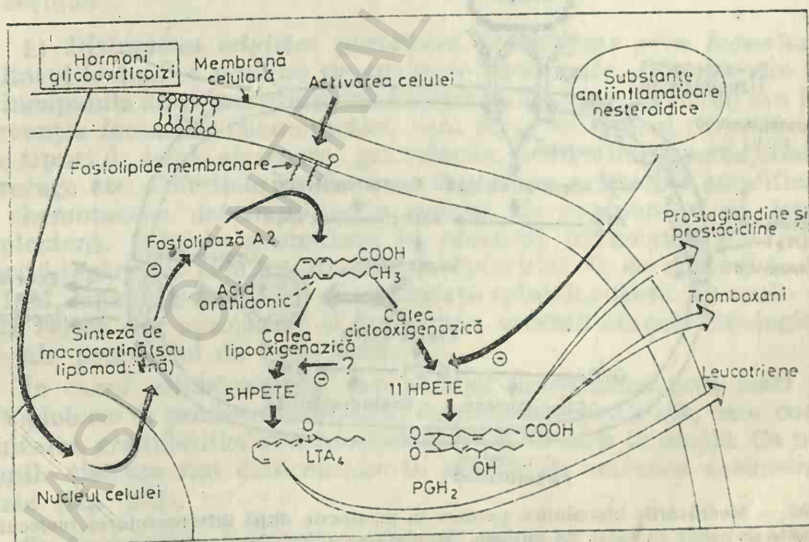


Fig. 292. — Reprezentare schematică a unei porțiuni dintr-un mastocit activat cu indicarea căilor de sinteză a principalelor substanțe stimulatoare ale reacțiilor inflamatorii. Sînt menționate și căile de inhibare a sintezei lor (hormonii glicocorticoizi care induc sinteza de macrocortină sau lipomodulină), care blochează cele două căi de sinteză prin inhibarea fosfolipazei A_2 și substanțele antiinflamatoare nesteroidice (după Gualde, 1985).

terea concentaţiei AMPc intracitoplasmatic şi diminuarea activităţii sistemului enzimatic răspunzător de eliberarea mediatorilor. În consecinţă, determină supresia eliberării de amine vasoactive, scăderea permeabilităţii capilarelor sanguine şi relaxarea muşchilor netezi bronhici. Acest rol contradictoriu al AMPc, reprezentat de inhibarea eliberării mediatorilor anafilactici, atît de deosebit de rolul său în alte sisteme celulare cu funcţii de secreţie, nu are o explicaţie univocă.

Concentraţia AMPc în celulă poate fi influenţată şi prin stimularea externă cu prostaglandinele PGE1 şi PGE2, care interacţionează cu subunitatea catalitică a adenilat ciclazei. Ea ar corespunde la 3 subunităţi receptor relativ independente. Revenirea la normal a concentraţiei AMPc se face nu numai prin diminuarea formării lui, ci şi prin acţiunea fosfodiesterazei, care îl converteşte la 5'-AMP inactiv.

Rolul guanilat ciclazei. Celulele-ţintă ale răspunsului anafilactic posedă un *receptor γ-colinergic*, reprezentat de guanilat ciclaza inactivă, legată de membrana celulară. Activarea ei de către substanţele colinergice (acetilcolină sau carbamilcolină), în doze foarte mici, determină eliberarea de mediatori anafilactici, independent de concentraţia AMPc în celulă. Guanilat ciclaza transformă GTP (guanozil-trifosfat) la 3'5'-guanozil monofosfat (GMPc). Ca şi AMPc, GMPc este distrus de fosfodiesterază, cu producere de 5'-GMP inactiv, a cărui creştere în celulă determină vasodilataţia arteriolelor şi capilarelor, contracţia muşchilor netezi bronhici, hipersecreţie bronhică şi creşterea permeabilităţii vasculare (fig.293).

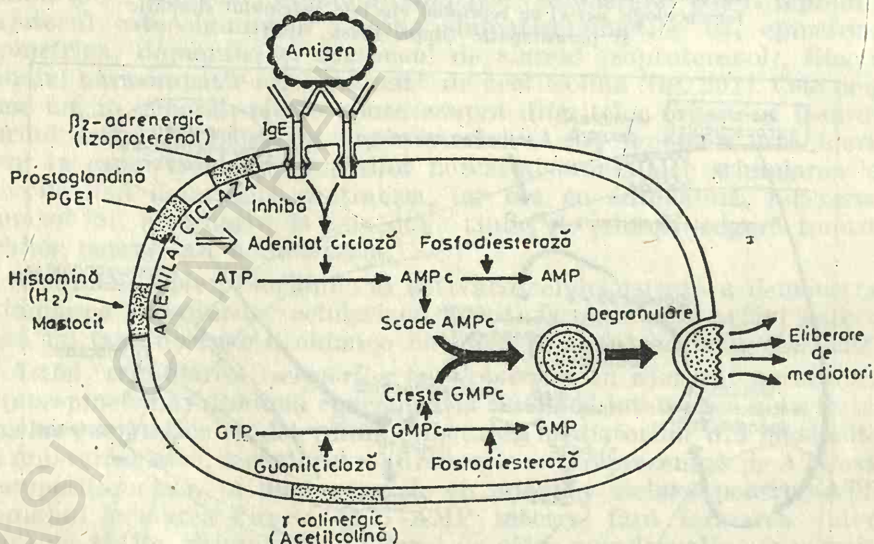


Fig. 293. — Modificările biochimice produse în mastocite după interconectarea moleculelor de IgE legate de celule de către un antigen. Amplasarea diferiţilor receptori pe suprafaţa celulei este arbitrară (după Haeney, 1984).

Mecanismul reglării. Conform *teoriei echilibrului de reglare* („Balance theory of regulation control"), controlul homeostatic al activării celulelor-

țintă, respectiv viteza și gradul în care cascada biochimică este completă sau nu în mastocite și bazofile, este asigurat de existența unui echilibru între concentrația celulară a AMPc și GMPc. Concentrația normală a celor doi compuși este, în mod evident determinată de echilibrul dintre activitatea receptorilor α, β și γ de pe suprafața mastocitelor și bazofilelor. Ea este, la rîndul său, corelată cu activitatea sistemelor de reglare simpatic (β-adrenergic) și parasimpatic sau colinergic (vezi fig. 291).

Cunoașterea acestui mecanism are o importanță fundamentală pentru terapeutică, permițînd atenuarea sau blocarea fenomenelor anafilactice cu ajutorul unor medicamente, care împiedică formarea sau eliberarea mediatorilor activi sau au efecte antagonice față de acțiunea lor.

Hipersensibilitatea de tip citotoxic (tipul II)

Reacțiile de tip citotoxic sînt stări de hipersensibilitate consecutive legării anticorpilor circulanți de determinanții antigenici situați pe suprafața unor celule sau de antigene (sau haptene) adsorbite pe suprafața unor celule sau țesuturi. Interacționînd cu complementul sau cu diferite celule efectoare, anticorpii mediază distrugerea celulelor-țintă și a țesutului înconjurător. Există și circumstanțe speciale în care legarea complexului antigen — anticorp de celule este urmată de activarea celulelor în locul apariției de leziuni. Pentru acest tip de reacție, unii cercetători au propus denumirea de *hipersensibilitate de tip stimulator* (tipul V).

Efectul citotoxic poate fi determinat de trei mecanisme principale de acțiune :

1) *Distrugerea celulelor purtătoare de antigene prin fagocitoză* este rezultatul leziunilor produse de enzimele lizosomale, eliberate din fagocitele incapabile să-și îndeplinească funcția fiziologică. Procesul are la bază intervenția factorilor chemotactici, care atrag în situsul respectiv numeroase tipuri de celule efectoare : granulocite, neutrofile, bazofile, eozinofile, macrofage etc. Diferitele produse de degradare a fibrinei amplifică efectele chemotactice determinate, în special, de componenți ai sistemului complement. Celulele acumulate în procesul inflamator sînt activate, datorită legării lor prin intermediul receptorului Fc de moleculele de IgG sau IgM, legate la rîndul lor de suprafața celulelor-țintă. În unele cazuri, aceste celule sînt opsonizate și fagocitate, urmînd etapele fiziologice normale ale procesului de fagocitoză.

În cazul celulelor-țintă sau al unor substraturi prea mari pentru a fi înglobate se produce fenomenul de *fagocitoză frustrată*, care constă în expulzarea granulațiilor și a conținutului lizosomilor în mediu. Ca urmare, leziunile tisulare sînt determinate în special de acțiunea enzimelor lizosomale (fig. 294).

2) *Distrugerile tisulare mediate de sistemul complement* au la bază următorul mecanism molecular :

a) anticorpii legați de antigenele de pe membrana celulei-țintă leagă componentul C1 și determină activarea complementului pe *calea clasică* ;

b) compușii C3b și $\overline{\text{C4b}}$ $\overline{\text{C2b C3b}}$ (C5 convertaza) se fixează pe suprafața celulei-țintă, opsonizînd-o față de acțiunea fagocitelor care posedă pe suprafață receptori de C3. Final, C5 convertaza activează calea litică și producerea de leziuni membranare prin acțiunea complexului litic (C5b, 6, 7, 8, 9).

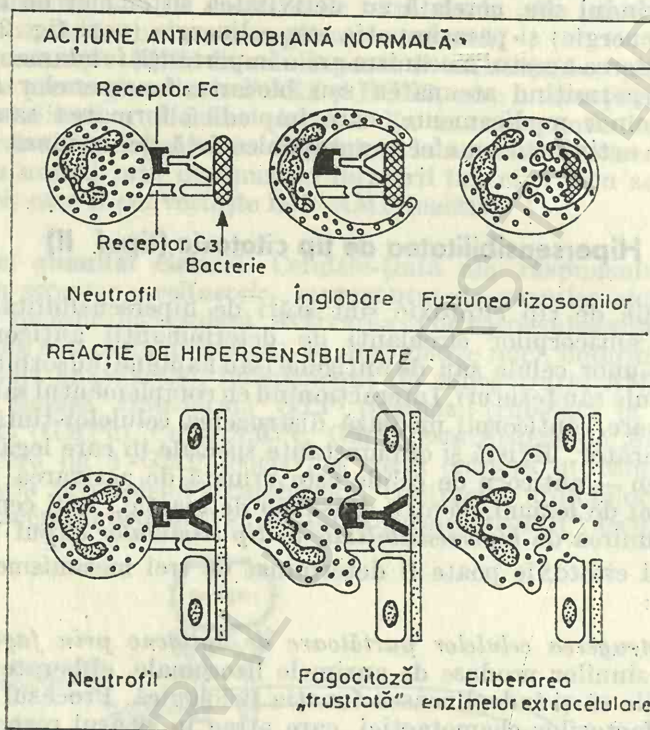


Fig. 294. — Mecanismele de producere a leziunilor în hipersensibilitatea de tip II. Rolul fagocitozei „frustrate" prezentat comparativ cu activitatea antimicrobiană normală a neutrofilelor (după Hood și colab., 1984).

3) *Efectul citotoxic mediat de acțiunea unor celule efectoare* nefagocitare — *celulele Killer* — purtătoare de receptori Fc, care se leagă de moleculele de IgG de pe suprafața celulelor-țintă. În acest proces, cunoscut sub denumirea de *citotoxicitate mediată de celule, dependentă de anticorpi*, moleculele de IgG formează o punte între celula-țintă și celulele efectoare, prin legarea lor, pe de o parte, de antigene, prin regiunile Fab, și, pe de alta, de celula K prin regiunea Fc.

Consecințele hipersensibilității de tip citotoxic. Reacțiile de tip citotoxic pot afecta practic orice țesut, prin inducerea formării de anticorpi față de diferiți constituenți tisulari. Au fost descrise stări patologice care afectează integritatea hematiilor, a trombocitelor, a neutrofilelor, a limfocitelor T și a diferite țesuturi și organe (rinichi, miocard, creier, tiroidă, testicul, ovar, piele etc.).

Astfel, *maladia hemolitică a nou-născutului* are la bază izoimunizarea mamei Rh negative față de hematiile fătului Rh pozitiv, care poartă cel mai adesea antigenul RhD. Fenomenul se bazează, pe de o parte, pe faptul că fătul are o serie de gene, diferite de cele ale mamei, inclusiv gene de histocompatibilitate, provenite de la organismul patern, în așa fel încît poate fi considerat ca o alogrefă pe toată durata existenței sale intrauterine. Pe de altă parte, relația mamă—făt implică un schimb permanent, bidirecțional, de materiale antigenice prin placentă. Celulele și alte produse antigenice fetale trec în organismul matern, respectiv în sînge și în sistemul limfatic, ajungînd în ganglionii limfatici, iar limfocitele sensibilizate în ganglioni, precum și în alte celule materne traversează placenta, pentru a ajunge în organismul fătului. Odată cu acestea trec și moleculele de IgG produse în organismul matern, care recunosc hematiile fetale și le lizează. Primul copil Rh incompatibil este, în general, sănătos deoarece sensibilizarea este evidentă numai după ce s-a produs într-o sarcină precedentă. Accidentele apar la cel de-al doilea copil și se măresc progresiv pe măsură ce mama se reimunizează la fiecare sarcină.

Lezarea hematiilor este întîlnită și în alte situații, ca, de exemplu, în *reacțiile posttransfuzionale* bazate pe incompatibilitate. În cazurile de incompatibilitate netă, anticorpii anti-ABO, aparținînd în general izotipului IgM, determină accidente grave, datorită aglutinării hematiilor, activării complementului și fenomenelor de hemoliză intravasculară. Unele imunizări au ca rezultat producerea de anticorpi IgG, care au proprietăți aglutinante mai reduse decît IgM, dar pot genera reacții patologice posttransfuzionale generale, asociate cu hemoliză și depunerea conținutului hematiilor în rinichi, urmată de necroza tubilor uriniferi. Fenomenele minore de incompatibilitate nu se însoțesc de liză. Legarea anticorpilor de antigenele de pe suprafața hematiilor are însă ca rezultat intensificarea fagocitării acestora de către celulele sistemului fagocitar mononuclear din splină.

Lezarea hematiilor prin fenomene de hipersensibilitate de tip citotoxic este întîlnită și în *anemia hemolitică autoimună* sau în cea *indusă de medicamente* (penicilină, tetraciclină, antihistaminice, clorpromazină, PAS, piramidon, chinină, chinidină etc.).

Trombocitele pot fi sensibilizate de anticorpi în diferite stări patologice ca : *purpura trombocitopenică idiopatică* sau *trombopeniile* produse de o gamă largă de medicamente.

Fenomenele de hipersensibilitate de tip citotoxic sînt implicate, de asemenea, în apariția unor *granulocitopenii* (cu anticorpi antipolimorfonucleare sau anticorpi față de diferite medicamente adsorbite pe granulocite), precum și într-o serie de boli grave ca *nefrita nefrotoxică* (anticorpi față de antigenele din membrana bazală a glomerulului), în fenomenele de *respingere supraacută a grefelor* (la organisme receptoare cu anticorpi preformați față de antigenele din țesutul grefat), în *miastenie* etc.

Hipersensibilitatea prin complexe imune (tipul III)

În cursul răspunsului imun normal, complexele rezultate din combinarea antigenelor cu anticorpii sînt, în mod obișnuit, eliminate prin

fagocitoză. În circumstanțe speciale însă, ele pot fi depuse la nivelul unor țesuturi sau organe, generînd leziuni severe, ca rezultat al activării unor mediatori serici și/ sau al posibilității de a interacționa cu unele celule (fig. 295). Modificările structurale și biochimice ce decurg din acest fenomen pot sta la baza unor leziuni de vascularită, localizată sau generalizată, a unor modificări în arhitectura normală a țesuturilor și chiar a unor necroze celulare. Evoluția acestor fenomene *in vivo* depinde de cantitățile antigenelor și anticorpilor prezenți în organism, de izotipul anticorpilor și de capacitatea lor de a se fixa pe anumite celule sau de a activa complementul, ca și de natura antigenului. Astfel, antigenele monovalente produc complexe imune mici, care rămîn în circulație foarte mult timp, fără depunere în țesuturi. Antigenele multivalente formează complexe cu compoziții diferite în funcție de raportul molar al reactanților. Factorul cel mai important în declanșarea acestui tip de hipersensibilitate este reprezentat de raportul antigen/anticorp.

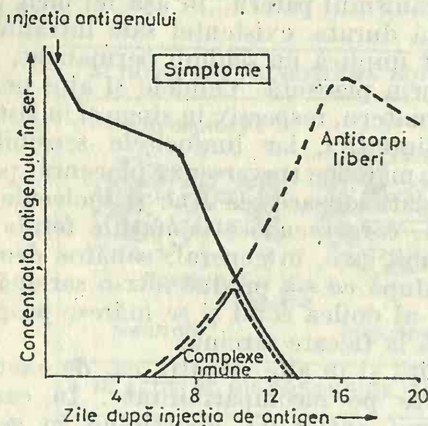


Fig. 295. — Evoluția bolii serului acute la iepure. Debutul simptomelor coincide cu apariția complexelor imune în circulație (după Haeney, 1984).

Experimental s-a demonstrat că complexele imune mici, formate în exces mare de antigen, sînt insuficiente în producerea acestei stări, între altele, datorită incapacității lor de a activa complementul. Cele formate în exces mare de anticorpi, de regulă mari și insolubile, sînt precipitate rapid, localizate la locul de depunere a antigenului și îndepărtate prin fagocitoză. Cele mai importante sînt complexele imune formate în exces moderat de antigen, deoarece au o mărime intermediară, sînt solubile, nu sînt fagocitate ușor, activează complementul și sînt răspîndite practic în tot organismul pe cale circulatorie. Dacă sînt menținute un timp limitat, leziunile sînt mici și tranzitorii. Cînd stimulul antigenic este îndelungat (ca, de exemplu, în cursul infecțiilor cronice sau al bolilor autoimune), leziunile induse în diferite țesuturi sînt persistente și au tendința de agravare. De menționat că, și în aceste cazuri, cele mai multe complexe imune sînt fagocitate de macrofage și neutrofile. Cu toate acestea, uneori, o parte rămîn în circulație și se depun la nivelul anumitor țesuturi. În boala serului, spre exemplu, se apreciază că 99% din complexele imune sînt îndepărtate prin fagocitoză, dar restul de 1% sînt suficiente pentru a produce boala.

Mecanismul leziunilor vasculare produse de complexele imune. Complexele imune leagă componentul C1 al sistemului complement, prin intermediul subunității C1q, determinînd activarea complementului și eliberarea anafilatoxinelor C3a și C5a. Componentul C3 determină eliberarea aminelor vasoactive din granulocitele bazofile, în timp ce C5a exercită o acțiune mult mai complexă, care implică efectul chemotactic asupra neutrofilelor, afluxul acestora în teritoriul respectiv, asociat cu activarea lor (stimularea producerii de H_2O_2 și creșterea puterii bactericide), creșterea activității procoagulante, sinteza de leucotriene de tip LTB4 care prelungesc permeabilitatea mărită a endoteliilor vasculare, precum și degranularea bazofilelor și a mastocitelor. În același timp, complexele imune activează trombocitele, determinînd, pe lîngă eliberarea de amine vasoactive (histamină și serotonină), agregarea lor. Ca urmare a acestor modificări are loc contracția endoteliilor vasculare, care, împreună cu activitatea aminelor vasoactive, mărește mult permeabilitatea vasculară. Agregarea plachetelor, care favorizează, la rîndul său, depunerea complexelor în peretele vascular, determină formarea de microcheaguri, care se depun pe suprafața endoteliilor, în contact cu structurile colagenice ale membranei bazale endoteliale. Neutrofilele acumulate local se leagă de complexele imune prin intermediul receptorilor FcIgG, dar întrucît fagocitoza lor este dificilă, datorită „legării" lor de peretele vascular, eliberează cantități importante de enzime lizosomale, care determină leziuni tisulare severe.

Boala serului

Descrisă de von Pirquet (1911), această formă de hipersensibilitate era întîlnită relativ frecvent în perioada utilizării serurilor imune heterologe (în special de cal), în terapia unor boli (tetanos, rabie etc.), de la care și-a luat și denumirea.

Semnele clinice apar după 7 — 14 — 21 de zile, cu febră, adenopatie generalizată, erupție eritematoasă urticariană generalizată, splenomegalie, artralgii, uneori edem extins al feței și al articulațiilor, hematurie etc. În perioada febrilă maximă se înregistrează neutrofilie și scăderea concentrației complementului seric. La persoanele sensibilizate anterior, boala serului apare mai repede (după 3 — 4 zile) și cu o cantitate mai mică de antigen (răspuns anamnestic).

Patogenia bolii serului a fost studiată experimental, prin reproducerea ei la iepure (Dixon și colab., 1958), utilizînd, în doze mari, un antigen, care dispare lent din circulație (albumina serică bovină, marcată radioactiv cu ^{131}I, 250 mg/kg corp) (fig. 296).

După o săptămînă în cursul căreia cantitatea de antigen circulant scade progresiv, apar anticorpii, care se leagă de antigenul rămas în sînge în cantități suficiente pentru a forma mici complexe antigen — anticorp, ce sînt „însămînțate" în diferite țesuturi. Ele se comportă ca o unitate macromoleculară inflamatorie, gata formată, care localizată în vasele de sînge determină hiperplazia endoteliului, modificări de permeabilitate și lezarea peretelui vascular.

Patogeneza acestor leziuni intra- și perivasculare ar implica, după Evans (1976), următoarele modificări:

1) fixarea complementului de către complexele imune antigen — anticorp determină agregarea și lezarea plachetelor, prin eliberarea unui factor leucocitar sau prin imunoaderență;

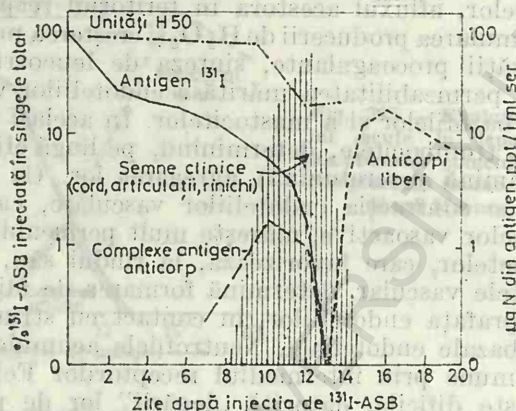


Fig. 296. — Maladia serului la iepure. Graficul prezintă modificările concentrației serice a antigenului liber (albumină serică bovină-marcată ^{131}I-ASB), a complexelor antigen — anticorp și a activității complementului după injectarea la iepure, la momentul 0, a 250 mg ^{131}I-ASB/kg greutate corporală. Toate animalele prezintă leziuni cardiovasculare, articulare și renale în perioada marcată prin regiunea hașurată. Se remarcă posibilitatea detectării anticorpilor liberi după ce antigenul marcat este eliminat din organism. În perioada formării complexelor imune, titrul complementului scade, fapt reflectat în scăderea titrului hemolitic global (după Dixon, 1965).

2) plachetele lezate eliberează amine vasoactive, care măresc permeabilitatea endoteliului vascular;

3) complexele imune pătrund în peretele vaselor sanguine, fixează complementul și determină formarea factorilor chemotactici C5a, C5b,6,7, care stimulează afluxul de neutrofile;

4) acestea pătrund în peretele vascular, înglobează complexele imune și eliberează enzime lizosomale, care lizează celulele și conjunctivul înconjurător, accentuînd fenomenele inflamatorii.

5) Pe măsură ce răspunsul imun progresează, producînd cantități mărite de anticorpi, se formează complexe antigen — anticorp din ce în ce mai mari, care nu produc leziuni, deoarece sînt fixate cu aviditate în ficat și în splină, unde sînt catabolizate și eliminate. La un moment dat, complexele imune dispar din circulație, anticorpii apar în stare liberă și leziunile inflamatorii regresează (fig. 297).

Aceste date demonstrează că boala serului este determinată de interacțiunea antigen — anticorp în sistemul circulator, cu formarea de complexe imune. Leziunile și starea de boală sînt asociate exclusiv cu prezența de complexe imune circulante, formate la un exces moderat de

antigen. Boala serului evoluează ca o stare de hipersensibilitate avînd elemente proprii anafilaxiei, precum și fenomenului Arthus. Nevoia de complexe imune și de complement, precum și prezența leziunilor vasculare focale permit considerarea ei ca o formă sistemică (generalizată) de fenomen Arthus.

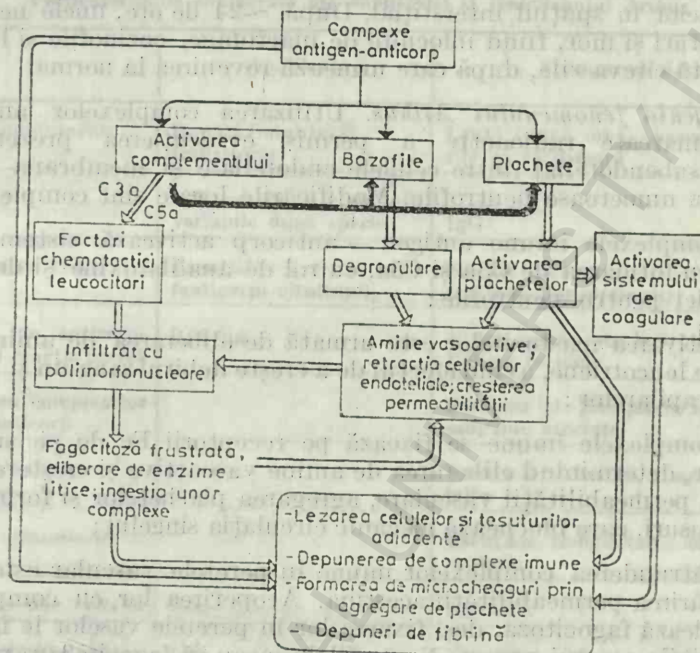


Fig. 297. — Mecanismul de producere a leziunilor induse de formarea complexelor imune.

Fenomenul Arthus

A fost descris în anul 1903 la iepuri injectați repetat, subcutanat sau intradermic, cu antigene solubile (ser de cal), la care, după cîteva săptămîni, injecția produce o reacție inflamatorie locală. Modificările debutează cu tumefiere locală, eritem după 1 — 2 ore cu indurație și hemoragii punctiforme, urmate de necroză cu Ø de 2 — 3 cm și edem cu Ø de ~ 3 ori mai mare. Modificările sînt maxime după 4 — 8 ore și dispar după 10 — 12 ore. Reacția poate fi declanșată și cu complexe antigen — anticorp formate *in vitro*, dar cu intensitate mai mică decît cele produse *in situ*.

Evoluția fenomenului Arthus a fost urmărită *in vivo* cu ajutorul unor dispozitive speciale, implantate pe urechea de iepure, sau prin adăugarea antigenelor pe un țesut transparent vascularizat, cum sînt mezenterul de cobai sau punga jugală la hamster. Modificările apar după ~15 minute, sub forma unei încetiniri a circulației sanguine în capilare și în

venule (unde antigenul este absorbit inițial). Ulterior apar grămezi de plachete sanguine și neutrofile care aderă inițial între ele și apoi de endoteliul capilar și venos. În unele vase mici, circulația încetează complet, datorită blocării lor mecanice de trombusurile care conțin plachete și neutrofile. Concomitent, peretele venulelor funcționale este alterat, permițînd extravazarea hematiilor, producerea de edem și migrarea masivă a neutrofilelor în spațiul interstițial. După ~24 de ore, unele neutrofile, suferă alterări și mor, fiind înlocuite de macrofage, eozinofile și limfocite care persistă cîteva zile, după care urmează revenirea la normal.

Patogenia fenomenului Arthus. Utilizarea complexelor antigen — anticorp marcate radioactiv a permis evidențierea prezenței lor în stratul subendotelial (între celulele endoteliale și membrana bazală), împreună cu numeroase neutrofile. Modificările locale sînt complexe :

1) complexele imune antigen — anticorp activează sistemul complement, cu formarea de C3a și C5a, cu rol de anafilatoxine și de factori chemotactici pentru neutrofile ;

2) activarea mastocitelor este urmată de eliberarea de amine vasoactive și de leucotriene, avînd efectul de a crește debitul sanguin și permeabilitatea capilarelor ;

3) complexele imune se fixează pe receptorii Fc de pe suprafața plachetelor, determinînd eliberarea de amine vasoactive și creșterea suplimentară a permeabilității vasculare, agregarea plachetelor și formarea de microtrobusuri, care blochează mecanic circulația sîngelui ;

4) pătrunderea complexelor imune în peretele vascular este favorizată de mărirea permeabilității acestuia. Acoperirea lor cu componentul C3b stimulează fagocitoza, deși fixarea lor în peretele vaselor le face mai greu accesibile acestui proces. Neutrofilele încep să fagociteze rapid complexele imune, foarte multe eliminînd în același timp enzime lizosomale din granulații. Enzimele care trec în circulație sînt inactivate de inhibitori, dar cele rămase în vecinătatea complexelor imune determină necroza focală a peretelui vascular.

Examenul microscopic evidențiază prezența leziunilor arteriolare, extravazare de hematii în țesutul conjunctiv, cu agregate de neutrofile și plachete aderente de peretele vascular, existența unor microtrombusuri bogate în neutrofile și plachete, care obstruează vasele mici, fenomene de ischemie și necroză. Dacă leziunile persistă > 12 ore, neutrofilele mor și sînt înlocuite de macrofage și eozinofile. După 48 de ore, majoritatea complexelor imune sînt îndepărtate, iar cele rămase se găsesc în macrofagele care au înglobat neutrofilele distruse.

Fenomenul Arthus apare ca un exemplu de patologie locală prin complexe imune, determinată la animale care au un nivel ridicat de anticorpi precipitanți. Unele particularități evidente (rolul minor al mastocitelor, apariția semiîntîrziată a fenomenelor etc.), diferite de hipersensibilitatea imediată (tabelul nr. 72) nu ar justifica, după unii cercetători, încadrarea fenomenului Arthus în această categorie (Benveniste, 1976). După Barrett (1974) însă, deosebirile nu sînt fundamentale, deoarece

fenomenul Arthus este condiționat de prezența anticorpilor circulanți și reacția *in vivo* apare imediat. Numai exteriorizarea sa cutanată necesită o perioadă mai mare de timp.

Tabelul nr. 72

Particularitățile comparate ale anafilaxiei și fenomenului Arthus

	Anafilaxie	Fenomenul Arthus
Apariția simptomelor	Rapidă (minute) și tranzitorie	Lentă (după ore), necesită cîteva zile ca să dispară
Izotipul Ig	IgE, rar subclase de IgG variabile după specie	IgG
Legarea Ig de celule	Esențială (anticorpi citotropi)	Nu are loc (anticorpi precipitanți)
Cantitatea de anticorpi necesară în reacția pasivă	0,01 μg	10 mg intravenos la iepure; 100 μg în piele
Evidențierea complexelor antigen—anticorp		Formare și precipitare în vasele sanguine afectate
Nevoia de sistem complement	—	Esențială. Absența stopează evoluția
Nevoia de granulocite neutrofile	—	Esențială. Indepărtarea lor stopează evoluția
Participarea mastocitelor	Esențială	Accesorie
Inhibarea de antihistaminice	Da	Nu
Aspecte clinice dominante	Creșterea permeabilității vasculare Contracția mușchilor netezi	Complexe: edem, infiltrat celular, hemoragii, ischemie locală, necroză, distrugeri tisulare locale

Stări patologice induse de complexele imune circulante

În afară de boala serului, determinată de injectarea unei cantități mari de antigen (ser imun heterolog sau proteine străine), au fost descrise o serie de stări patologice consecutive unei antigenemii continue, determinată de patru categorii de factori:

1) **Infecții bacteriene cronice.** În afară de accidentele determinate de eliberările acute de produși bacterieni, persistența îndelungată a unui proces infecțios asociată cu o eliberare, în general slabă, dar continuă, de antigene poate determina apariția unor stări patologice ca glomerulonefrita sau endocardita poststreptococică, otita stafilococică etc. Ideea că leziunile tisulare produse de infecțiile bacteriene cronice nu sînt produse de toxine sau de alți factori bacterieni, ci de complexe imune nu este unanim

acceptată (Richerson, 1984). Există însă exemple suficiente care demonstrează existența unor infecții > 10 ani, care nu produc toxine sau alte substanțe cu efecte letale sau măcar nocive pentru gazdă. Astfel, Türk (1979) citează cazul bolnavilor de lepră lepromatoasă, care pot adăposti milioane de bacili/gram de piele fără simptome clinice evidente. Chiar în cazul unor patogeni care produc enzime cu potențial ridicat de lezare celulară, acestea nu sînt active decît în perioada de debut a bolii, o perioadă limitată de timp. Ulterior, aceste enzime distructive sînt inactivate de apariția anticorpilor antienzime, cu formare de complexe imune.

Rolul complexelor imune în patologie este demonstrat de: prezența antigenelor bacteriene în compoziția lor; depunerea complexelor imune în țesuturi; interacțiunea lor cu fagocitele și alte celule efectoare imunocompetente, ca și de capacitatea de a activa cascada sistemului complement. După Hoiby (1986), patogenia acestei categorii de boli este ilustrată de fibroza cistică și de endocardite, în care este evident rolul esențial al unor „infecții criptice" ce asigură persistența cronică a agentului patogen, în condiții inaccesibile sistemelor fagocitare, care sînt astfel incapabile să determine eliminarea lor.

Fibroza cistică (maladie asociată cu triada pneumopatie cronică, insuficiență pancreatică și concentrația mărită a electroliților în transpirație) are ca agent infecțios o tulpină de *Pseudomonas aeruginosa* care produce alginat. Această substanță mucoidă înconjură cantități mari de celule bacteriene, protejîndu-le de acțiunea fagocitelor. Boala poate dura pînă la 15 ani, înainte de deces, fără ca bacteriile să se răspîndească în alte organe.

Endocardita infecțioasă, produsă de streptococul α-hemolitic, *S. faecalis* sau *Staphylococus aureus*, este prototipul unei infecții sistemice, cu bacteriemie moderată (10 — 100 bacterii/ml), care asigură stimularea antigenică cronică a sistemului imunitar și producerea de anticorpi (IgG, în principal, dar și IgM și IgA). Producerea continuă de complexe imune este asigurată de persistența agenților patogeni la adăpost de mecanismele imunitare, în „vegetațiile" avasculare formate din fibrină, și trombocite pe valvele cardiace. Persistența complexelor imune în circulație nu este dăunătoare, în timp ce depunerea lor determină distrugeri vasculare, cu consecințe hemodinamice grave, asociate frecvent cu manifestări patologice extravasculare (în rinichi, piele, articulații etc.).

2) **Infecțiile virale cronice** au ca prototip evoluția infecției cu virusul choriomeningitei limfocitare (VCML). Animalele infectate la naștere, devenite parțial tolerante, poartă virusul în sînge tot restul vieții. La vîrsta adultă, declanșarea unui răspuns imun atenuat are ca rezultat producerea de anticorpi, care formează complexe imune prin combinarea cu virusul circulant. Animalele mor nu datorită virusului infectant, ci din cauza depunerii complexelor imune pe membrana bazală glomerulară, cu consecințele dăunătoare care decurg.

Un mecanism similar este bănuit în hepatita B la om și în anemia infecțioasă a cailor.

3) **Antigenele autologe** pot asigura formarea permanentă de complexe imune, ca rezultat al producerii continue de anticorpi față de antigene-self. Boala consecutivă depunerii complexelor antigen — anticorp în țesuturi apare ca o complicație a unei boli autoimune, deoarece sistemul fagocitar supraîncărcat nu le poate îndepărta din organism.

Unanue (1977), precum și Høidy și colab. (1986) descriu ca tipic pentru acest mecanism *lupusul sistemic eritematos* (LSE), caracterizat prin prezența anticorpilor față de ADN nativ și față de o serie de constituenți citoplasmatici. Anticorpii ca atare nu sînt dăunători, deoarece nu pot pătrunde în celule. Ei se combină cu ADN și alte antigene intracelulare, cînd acestea sînt eliberate din celulele normale, distruse în cursul procesului fiziologic de turnover. Complexele imune ADN — anti-ADN se depun, în principal, în rinichi datorită afinității lor speciale pentru membrana bazală a glomerulului.

Roitt și colab. (1986) citează și cazul extrem al *poliartritei reumatoide*, în care anticorpii anti-IgG umane sînt produși *in situ* de plasmocitele din sinovială, în așa fel încît complexele imune sînt formate local.

4) **Agenții externi** (antigene de proveniență vegetală, fungică sau animală), în special inhalați în mod cronic, determină formarea de complexe imune și apariția unor boli ca : *boala crescătorilor de păsări* (antigene aviare) sau *boala plămînilor de fermier* (anticorpi antiactinomicete), datorită expunerii îndelungate la fînul „mucegăit" și la gunoiul de grajd.

Lista bolilor produse de complexele imune este mai mare și are tendința să crească. Ea include :

1) *boli induse de infecții bacteriene cronice* : artrite, vascularite, meningite (streptococ), glomerulonefrite, endocardite, lepră lepromatoasă etc. ;

2) boli induse de infecții *virale* după : mononucleoză, hepatită, oreion, variolă, varicelă, adenovirus, virus citomegalic etc. :

3) boli *parazitare* : nefropatia malarică, glomerulonefrită din toxoplasmoză și schistosomiază ;

4) *stări autoimune* : artrita reumatoidă, scleroza sistemică, tiroidita Hashimoto ;

5) *alte stări patologice* : miastenia gravis, pemfigus, scleroza multiplă, sarcoidoza etc.

Factorii implicați în localizarea complexelor imune

1) *Mărimea complexelor imune*. După Unanue (1976), complexele imune cele mai importante pentru patogenia bolilor citate sînt cele formate din 1—2 molecule de antigen și 1—2 molecule de anticorpi, deoarece se leagă mai puțin avid de fagocitele hepatosplenice, circulă mai mult în organism și se pot localiza mai ușor. După Leslie (1985), celulele Kupffer ar avea un rol important în eliminarea complexelor mici, solubile. Eliminarea complexelor imune în ficat pare să necesite prezența IgG și C3.

Hematiile, acoperite doar cu C3, aderă de celulele Kupffer, dar nu sînt fagocitate, iar cele acoperite doar cu IgG sînt sechestrate lent în splină. Un rol important în reținerea complexelor imune în macrofagele hepatice îl au componentele glucidice ale IgG. Complexele mari (19S) și foarte mari sînt eliminate rapid de celulele sistemului fagocitar mononuclear. Opinia unanimă este că în general complexele antigen — anticorp cu dimensiuni intermediare formate în exces moderat de antigen întrunesc calitățile optime pentru a fi depuse, deși după Hoiby și colab. (1986), un rol important ar reveni și complexelor prea mari pentru a fi fagocitate.

2) *Calitatea anticorpilor.* Rolul complexelor imune în patologie depinde, în mare măsură, nu numai de concentrația relativă a antigenelor și anticorpilor, ci și de clasa și subclasa Ig, datorită diferențelor în capacitatea lor de a activa complementul, de a interacționa cu celulele sistemului imunitar, proprietăților lor biologice diferite. Astfel, IgG1 și IgG3 au capacitate mai mare de activare a complementului și de legare de celule decît IgG2. IgG4 leagă C1q, dar are o capacitate slabă de interacțiune cu monocitele, macrofagele și neutrofilele. Eliminarea complexelor antigen — anticorp și pericolul potențial pentru gazdă sînt, de asemenea, corelate cu calitatea Ig. În general, complexele care conțin molecule de IgG cu activitatea slabă de legare de celule sau de C1q pot scăpa de fagocitoză și în același timp persistă perioade mai îndelungate în circulație. Ca urmare, un defect genetic ce determină producerea de anticorpi cu afinitate slabă de legare poate asigura producerea de complexe imune cu dimensiuni relativ mici, patogene.

3) *Eliberarea de amine vasoactive* de către plachetele sanguine (după unii autori și de mastocite și bazofile) mărește permeabilitatea endoteliilor și favorizează pătrunderea complexelor imune în peretele vascular. Dovada o constituie faptul că trombopenia indusă experimental, ca și tratamentul cu antihistaminice atenuează acțiunea lor.

4) *Factorii hemodinamici.* Complexele imune se depun, de preferință, în vasele cu presiune sanguină mare, ca, de exemplu, în capilarele glomerulului renal, fapt demonstrat și experimental: ligaturarea parțială a arterei renale diminuă depunerea complexelor, în timp ce hipertensiunea indusă experimental o favorizează. Regiunile cu turbulență mare, cum sînt cele corespunzătoare bifurcațiilor arterelor sau de la nivelul filtrelor cu structură favorizantă (plexul coroid, epiteliul corpilor ciliari), sînt regiuni privilegiate pentru depunerea complexelor antigen — anticorp.

5) *Starea fiziologică a sistemului fagocitar* are, de asemenea, o importanță deosebită. Depunerea complexelor este favorizată de blocarea prealabilă sau de încărcarea masivă a macrofagelor din ficat și splină cu substanțe particulate.

6) *Particularitățile structurale și funcționale ale diferitelor țesuturi.* Această proprietate este ilustrată cel mai bine de rinichi, organul cel mai afectat de depunerea complexelor imune, prin trei particularități: a) structura fenestrată a endoteliului, care permite contactul membranei bazale glomerulare cu sîngele; b) presiunea mare a sîngelui (~ de patru ori mai mare decît în alte capilare); c) circulația intensă a sîngelui. Com-

plexele imune pot fi evidențiate cu ajutorul imunofluorescenței, sub forma unor depozite granulare neregulate, de-a lungul pereților capilarelor. Rezultatul final al depunerii lor este insuficiența renală cronică, cu proteinurie, azotemie și eventual moarte.

Hipersensibilitatea de tip întîrziat (tipul IV)

Reacțiile din această categorie sînt expresia tipică a unor procese de imunitate mediată celular, respectiv mediate de celulele T sensibilizate. Caracterul „întîrziat" se referă la momentul apariției evidente a reacției determinate de stimulul declanșator și nu la inducerea ei, care are o durată de același ordin ca răspunsurile imune normale.

Primele reacții de acest gen au fost observate de Jenner (1792), care a descris particularitățile reacțiilor inflamatorii consecutive vaccinării antivariolice cu virusul vaccinei („Cowpoxvirus") în pielea oamenilor, care au avut variolă sau au mai fost vaccinați. Ulterior, Koch (1890) a descris hipersensibilitatea dobîndită de cobai în cursul infecției cu *Mycobacterium tuberculosis*, în care primoinfecția este urmată, după 10–14 zile, de apariția unui nodul local (indurație), cu adenopatie regională. În săptămînile următoare, leziunea locală evoluează pînă la necroză și ulcerație, care persistă pînă la moartea animalului. Dacă însă după cîteva săptămîni se face a doua injecție cu *Mycobacterium tuberculosis*, indurația la locul de inoculare apare numai după 24 de ore, este urmată de ulcerație și evoluează spre vindecare. Reacția, cunoscută sub denumirea de *fenomenul Koch*, reflectă, în același timp, existența unei reacții locale de hipersensibilitate (apariția mai rapidă a leziunilor) și o creștere a rezistenței, pentru că reacția evoluează spre vindecare. Reacția secundară poate fi declanșată și cu bacterii omorîte, ca și cu tuberculină, care nu produc nici un efect la animalele sănătoase.

Caracterul specific imunitar al acestui gen de reacții a fost determinat pe baza mai multor criterii:

1) necesitatea unui stimul antigenic inductor;

2) reacția apare la individul sensibilizat numai după o reexpunere la antigenul specific inductor;

3) necesitatea unei perioade de latență anterioară sensibilizării (de 7–10 zile), aproximativ egală cu cea necesară pentru producerea unui răspuns imun;

4) existența unui răspuns de tip secundar (anamnestic);

5) posibilitatea efectuării unei desensibilizări.

După ce Chase (1945) a demonstrat că hipersensibilitatea cutanată la tuberculină poate fi transferată pasiv la organismele sănătoase cu ajutorul celulelor și nu cu anticorpii serici, această formă de sensibilizare a fost numită hipersensibilitate *mediată celular*. Aceasta a permis și gruparea răspunsurilor imune, în general, în două grupuri mari: *mediate celular* și *mediate umoral*. Deși foarte utilă în practică, terminologia este destul de

ambiguă: mediatorii imunității umorale (Ig) sînt produși de celule, răspunsul imun mediat celular depinde frecvent de factori solubili umorali (limfokine), cele două tipuri de răspuns sînt frecvent asociate etc.

Tabelul nr. 73

Comparație între particularitățile reacțiilor de hipersensibilitate de tip imediat și întîrziat

	Hipersensibilitatea de tip imediat	Hipersensibilitatea de tip întîrziat
Inițiatorul	Antigen și haptene injectate	Antigene și contact cutanat
Timpul necesar pentru apariția fenomenelor	Cîteva minute de la injecția declanșatoare; atenuare în cîteva ore	Apare treptat; maximum 24—72 de ore; dispariție lentă
Componentul imunitar activ	IgE, la unele specii și subclase ale altor izotipuri de Ig	Limfocite T_{DH}
Rolul anticorpilor	Esențial	Nul, cu excepția hipersensibilității cutanate cu bazofile
Transferul pasiv	Posibil cu anticorpi (ser)	Numai cu celule T vii sau cu factorul de transfer
Modificări biochimice	Histamină, serotonină, kinine, PAF, prostaglandine, leukotriene, tromboxani, variabile după specie	Limfokine
Țesutul-țintă	Mușchiul neted din diferite organe (variabile după specie); peretele vascular	Pielea; implicare posibilă generalizată; vascularizat, dar și relativ avascular
Modificări histologice	Predominant neutrofile, inițial cu puține mononucleare; degranularea mastocitelor și bazofilelor, edem; eozinofilie	Inflamație perivasculară cu predominarea celulelor mononucleare; neutrofile puține, eritem și indurație
Distrugeri tisulare	Frecvente	Rare. Nu sînt caracteristice pentru reacțiile obișnuite.
Terapeutică	Antihistaminice; catecolamine	Steroizi (compuși antiinflamatori)
Imunoterapie (Desensibilizare)	Relativ ușoară; temporară; anticorpi neutralizanți sau producere de anticorpi blocanți	Dificilă; temporară; mecanism necunoscut

Barrett (1976) consideră că termenul de hipersensibilitate mediată celular este neadecvat. El propune termenul de *hipersensibilitate mediată de limfokine*, pornind de la faptul că celulele T acționează prin intermediul produșilor lor — limfokinele — și nu prin contactul direct, fizic, cu antigenele. Prezența lor în cantitate foarte mică ar explica imposibilitatea transferului prin ser și necesitatea utilizării celulei vii, care a dus la conceptul de imunitate mediată celular. Tabelul nr. 73 prezintă particularitățile hipersensibilității de tip întîrziat în comparație cu cele ale hipersensibilității imediate.

În funcție de particularitățile lor de evoluție au fost descrise patru tipuri de hipersensibilitate întîrziată : 1) de tip tuberculinic, 2) de contact ; 3) de tip Jones-Mote și 4) de tip granulomatos (tabelul nr. 74).

Tabelul nr. 74

Particularitățile de evoluție ale diferitelor tipuri de hipersensibilitate întîrziată

Tipul	Intervalul de reacție	Manifestări predominante	Modificări histologice	Antigenul utilizat
Tuberculinic	48 ore	Indurație locală, tumefiere, ± febră	Monocite, limfocite, puține macrofage	Tuberculină, *Mycobacterium* intradermic
Contact	48 ore	Eczemă	Mononucleare, edem și tumefiere	Ni, substanțe din cauciuc, coloranți, percutan
Jones-Mote	24 ore	Tumefierea pielii	Bazofile, limfocite, mononucleare	Antigen solubil intradermic (ovalbumină)
Granulomatos	28 zile	Indurație cutanată	Celule epitelioide, celule gigante, macrofage, fibroză, necroză	Prezență persistentă de antigene infecțioase, complexe antigen — anticorp sau stimuli neimunitari (talc etc.)

În unele cazuri, aceste tipuri se pot succeda sau suprapune.

Reacția la tuberculină

Considerată ca o expresie tipică a fenomenelor de hipersensibilitate întîrziată la nivel cutanat, reprezintă, în fond, o reproducere atenuată a fenomenului Koch. Convențional se practică prin injectarea intradermică a unei doze mici din filtratul unei culturi de *M. tuberculosis în bulion* obținut după inactivarea agentului patogen prin căldură, filtrare și concentrare la volumul de 1/10 („Old tuberculin"). Principiul activ este o proteină PPD („Purified protein derivative"), cu g.m. ~2 000 dal, stabilă, neantigenică, cu activitate constantă.

La indivizii sensibilizați (bolnavi sau foști bolnavi), reacția locală caracteristică poate să apară după 6—10 ore, sub forma unei mici papule indurte, cu eritem moderat, care evoluează progresiv, ajungînd maximum după 24—72 de ore, după care dispare lent în cîteva zile. Reacțiile

mai intense se însoțesc de hemoragie și necroză și de unele fenomene generale, în general atenuate (ușoară hipertermie, diminuarea numărului limfocitelor circulante etc.). Reacția este negativă la organismele normale.

Injectarea unor doze mari de tuberculină la persoane sau animale hipersensibilizate poate declanșa reacții sistemice, evoluînd cu stare generală alterată, prostrație, hipotermie (cu 4—5°C), cefalee și, la animale, uneori survine moartea, după 5—30 de ore. Șocul tuberculinic poate fi indus la cobai după injectarea intraperitoneală a 5 mg de tuberculină.

La bolnavii de tuberculoză se produc reacții inflamatorii focale, ce pot activa leziunile inflamatorii din diferite organe.

Modificările histopatologice locale sînt caracteristice :

1) acumulare masivă de celule inflamatorii, cu predominanța granulocitelor extravazate după 12 ore ;

2) cînd reacția este maximă, un aflux de celule mononucleare, în special limfocite și macrofage, după care macrofagele diminuă progresiv ;

3) au mai fost semnalate unele alterări ale celulelor mononucleare : o etalare a citoplasmei, cu formare de numeroase vacuole, ștergerea desenului cromatinian al nucleului, reducerea sau abolirea proprietăților de fagocitoză și pinocitoză, a potențialului de mobilizare și de activitate enzimatică (Păunescu, 1975) ;

4) după 48 de ore predomină infiltratul perivascular limfocitar, care se extinde spre derm, dezorganizînd fasciculele de colagen. Edemul și eritemul sînt moderate, datorită faptului că modificările de permeabilitate vasculară nu au o mare amploare, fapt ce explică și caracterul indurat al leziunilor.

Reacția la tuberculină se poate practica la om pe mai multe căi : intradermic (testul Mantoux), prin scarificare cutanată (testul von Pirque), prin multipunctură (Tinetest) sau percutan (testul Vollmer — „patch test").

Reactivitatea este variabilă după specia animală. La om poate fi obținută cu doze foarte mici de PPD (0,02 µg) în „patch test", în care tuberculina pătrunde prin canalele glandelor sudoripare. La cobai necesită 0,05 µg. Șoarecele și șobolanul dau numai reacții foarte slabe.

Transferul pasiv al sensibilității la tuberculină. Deși transferul sensibilității la tuberculină a fost realizat inițial la cobai, de către Helmholtz (1909), cu sînge total defibrinat, și de către Bail (1910), cu broiaj de splină și de ganglioni limfatici de la un cobai bolnav, bazele științifice ale fenomenului au fost stabilite de Landsteiner și Chase (1942). Ei au realizat la cobai transferul sensibilității de contact față de clorura de picril, utilizînd un amestec de celule vii (2/3 macrofage și 1/3 limfocite și granulocite) provenite din exsudatul peritoneal al unor donatori sensibilizați. S-a demonstrat că transferul nu poate fi realizat cu ser sanguin (anticorpi) și nici cu supernatantul obținut după centrifugarea exsudatului. Transferul necesită prezența celulelor vii și depinde de gradul de sensibilizare a donatorului. Sensibilizarea apare după ~18—24 de ore, timp considerat ca necesar pentru ca limfocitele donatorului să ajungă în teritoriile în care este depus antigenul. Dovada o constituie faptul că fenomenele apar mult

mai repede (4–6 ore) dacă limfocitele donatorului sînt injectate în amestec cu antigenul. Sensibilitatea persistă numai atît timp cît limfocitele transferate sînt viabile, respectiv o perioadă mai îndelungată la animalele provenite din aceeași linie genetică. La animalele diferite genetic (alogenice), durata este de numai ~7 zile, deoarece organismul le îndepărtează printr-o reacție de respingere, ca în cazul grefelor incompatibile.

Natura celulelor implicate în transferul pasiv. Celulele răspunzătoare de transferul sensibilizator sînt limfocitele T. Deoarece cele mai multe experiențe de transfer au fost efectuate cu populații celulare mixte (macrofage și limfocite), experiențe suplimentare mai recente au demonstrat acest lucru: 1) îndepărtarea macrofagelor, bazată pe proprietatea lor de a adera de anumite straturi (vată de nylon), nu împiedică transferul; 2) tratarea suspensiei cu ser anti-Thy-1 și cu complement îl anulează; 3) marcarea radioactivă a celulelor T, provenite de la donator, cu [^{3}H] timidină este urmată de regăsirea lor în infiltratul specific, unde interacționează cu antigenul localizat în țesut.

Factorul de transfer. Lawrence (1958, 1960) a demonstrat posibilitatea transferului sensibilității la tuberculină și la proteina M din streptococ, utilizînd extracte leucocitare provenite din celulele organismelor sensibilizate, distruse prin îngheț — dezgheț. Factorul de transfer, a cărui compoziție chimică este necunoscută (a fost descris ca un polipeptid cuplat cu o moleculă de ARN cu g.m. mică), este dializabil, neantigenic, nu are funcție de anticorp și nu este neutralizat de anticorpi. Reacția de sensibilizare apare după cîteva ore de la injectarea lui intradermică și determină o sensibilizare maximă, după 2–3 zile. Starea conferită de el poate persista cîțiva ani și ar putea fi transmisă, după unii autori (Mota și colab., 1985), în serie, ca și cum ar fi replicabil. Se poate fixa și pe suprafața macrofagelor, care îl pot vehicula pasiv. Ar fi preformat în celulele mononucleare sau sintetizat după sensibilizarea lor.

După Hood și colab. (1984), factorul de transfer face parte din categoria limfokinelor.

Celulele efectoare ale hipersensibilității întîrziate pot fi grupate în trei categorii:

1) *Celulele recirculante* sînt celule T sensibilizate, cu viață lungă și memorie, produse în cursul imunizării anterioare, alături de celulele T efectoare. Ele sînt capabile să recunoască specific antigenul și să genereze mai multe celule T efectoare (răspuns anamnestic), cînd reîntîlnesc același antigen (Kozima și colab., 1979).

2) *Celulele rezidente* sînt prezente în țesutul respectiv, în mod normal, și sînt implicate în sensibilitate ca urmare a interacțiunii lor cu celulele T recirculante și cu antigenul specific. Aparțin la trei tipuri distincte: a) *celule endoteliale vasculare*, ce trebuie traversate de celulele recirculante și de celulele recrutate; b) *macrofage*, care încorporează, „prelucrează" și prezintă antigenele; c) *mastocite*, care sînt activate de celulele T, pentru a elibera mediatori vasoactivi, ce modifică celulele endoteliale, permițînd trecerea în țesuturi a celulelor recrutate, de la sediul lor normal din circulație.

3) *Celulele recrutate* sînt celule de proveniență medulară, respectiv monocite, bazofile și eozinofile. Natura lor variază: a) cu specia (la om predomină mononuclearele, la șoarece, neutrofilele); b) cu modul de imunizare (cînd antigenul nu conține *Mycobacterium* predomină bazofilele); c) cu natura imunogenelor (în cazul antigenelor parazitare predomină eozinofilele).

Celulele recrutate reprezintă ~95% din celulele infiltratului produs de hipersensibilitate. În mod normal, celule intravasculare, ele trec în țesuturi, ca urmare a influențelor chemotactice și limfokinelor produse de celulele T activate de contactul cu antigenul. Acești factori acționează sinergic cu mediatorii vasoactivi eliberați din mastocite, pentru a altera celulele endoteliale, creînd breșe în peretele vascular, prin care leucocitele migrează prin diapedeză (Colvin și Dvorak, 1975; Askenase, 1980).

Rolul celulelor T. Celulele care poartă specificitatea imunologică și a căror reacție cu antigenul determină răspunsul inflamator caracteristic hipersensibilității întîrziate aparțin unei populații speciale reprezentată de *limfocitele* T_{DH} („*D*elayed *h*ipersensitivity"). Studiile efectuate pe șoarece au demonstrat că ele au fenotipul Lyt-$1^{+}2^{-}3^{-}$, identic cu cel al celulelor $T_H(T4^{+})$ și diferite de celulele T_C și T_S (ambele Lyt-$1^{-}2^{+}3^{+}$ ($T8^{+}$)).

Celulele T_{DH} aparțin în mod normal fondului de celule circulante. În cursul reacțiilor de hipersensibilitate ele trec direct, prin citoplasma celulelor endoteliale înalte ale venulelor postcapilare (fenomenul numit *emperiopolesis*), la baza căruia s-ar găsi un proces de recunoaștere, determinat de interacțiunea dintre celulele endoteliale și celulele T.

Diferențierea și proliferarea celulelor T_{DH} de la precursorii lor este controlată de celulele T_H și T_S. Această particularitate a fost demonstrată experimental: pretratarea șoarecilor cu ciclofosfamidă, substanță ce distruge selectiv celulele T_S, mărește de cîteva ori gradul de sensibilizare, eliberînd celulele T_H de activitatea moderatoare a acestora.

Natura antigenelor recunoscute. Pentru a intra în acțiune, celulele T_{DH} trebuie în prealabil sensibilizate printr-o întîlnire cu antigenul. Timpul necesar pentru inducția sensibilizării este de ~7–14 zile, după prima injecție de antigen (~egal cu cel necesar pentru producția anticorpilor). Polizaharidele nu pot induce fenomene de hipersensibilitate întîrziată.

Antigenele implicate cel mai frecvent sînt proteine heterologe, constituenți virali sau bacterieni (*Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria*, *Salmonella* etc.), molecule din organisme mai complexe (*Leishmania*, *Trypanosoma*, *Schistosoma* etc.) și molecule foarte mici (haptene). Imunogenul cel mai eficient este reprezentat de cantități mici de antigene, mai ales dacă sînt asociate cu suprafața celulelor vii. Astfel, sensibilizarea la tuberculină este mult mai eficientă cu bacili vii sau cu BCG decît cu culturi omorîte.

Studiile efectuate pe cobai cu ajutorul unor proteine conjugate ca DNP-ASC (haptena dinitrofenol și molecula-purtătoare albumina serică de cobai) au arătat că anticorpii produși recunosc aproape exclusiv grupările DNP și sînt foarte puțin influențați de prezența componentei pro-

teice. Ei se combină la fel de bine cu haptena DNP cînd este legată de ovalbumină, de albumina serică bovină sau de aminoacidul lizină (Martz, 1977). Prin contrast, cobaii imunizați cu DNP-ASC răspund excelent prin fenomene de hipersensibilitate față de DNP-ASC, nu însă și față de DNP legat de alți purtători. Această comportare demonstrează că specificitatea recunoscută de celulele T_{DH} corespunde unei regiuni chimice mai mari, care include, pe lîngă haptenă, o anumită porțiune din proteina-purtător.

Modul de acțiune a celulelor T. Deși fac parte integrantă din mecanismele celulare caracteristice hipersensibilității întîrziate, celulele T_{DH} acționează recrutînd alte tipuri de celule la situsul de reacție. Ca urmare, deși răspunsul proliferativ este inițiat de recunoașterea specifică a antigenului de către celulele T_{DH}, o parte esențială a activităților celulare consecutive, răspunzătoare de reacția inflamatorie, este determinată de intervenția unor celule recrutate din rezerva medulară, din ganglionii limfatici sau din țesuturi. Experimental s-a demonstrat că după transferul unui număr cunoscut de limfocite marcate radioactiv cu [^{3}H] timidină, la un organism receptor compatibil, numai $\sim 10\%$ din ele sînt regăsite în infiltratul celular produs de reacția de hipersensibilitate. Ele sînt însă suficiente pentru declanșarea răspunsului imun și necesită recrutarea altor celule din rezerva medulară (macrofage), din ganglionii limfatici (limfocite neangajate imunologic) și din țesuturi (mastocite). Marcarea radioactivă a celulelor receptorului demonstrează prezența lor în infiltrat în proporție de 85—95% (Tsuyuguchi și colab., 1982).

Stimularea, activarea și declanșarea mecanismelor efectoare necesită interacțiunea celulelor T_{DH} cu celulele care prezintă antigenul. Cea mai activă în acest sens, la șoarece, este celula dendritică, similară macrofagului, care poartă numeroase molecule Ia pe suprafață, dar are o slabă activitate fagocitară (Steinman, 1979). Interacțiunea lor este supusă restricției CMH, relevată de capacitatea celulelor T_{DH} de a recunoaște antigenele numai în prezența moleculelor antigenice din clasa II CMH. Primele date în acest sens au fost semnalate de Landsteiner și Chase (1942), în experimentele citate anterior, de transfer pasiv al sensibilității la substanțe chimice. Ei au arătat că transferul reușește constant între animalele singenice și numai inconstant în populațiile heterogene genetic ("outbread" Miller și colab. (1976) au validat aceste observații, demonstrînd că în cazul receptorilor alogenici, limfocitele transferate sînt respinse, ca orice grefă alogenică, în timp ce la receptori cu antigene CMH identice, ele sînt acceptate, chiar dacă fondul de gene care nu aparțin CMH este diferit.

Rolul limfokinelor. Celulele T_{DH} activate sintetizează și secretă un număr mare de limfokine : MIF, MAF, factorul de agregare a macrofagelor, factori chemotactici pentru neutrofile, eozinofile, limfocite, limfotoxine, factori mitogeni (activi pe celulele T), factorul LIF inhibitor al limfocitelor T_H, SRF („*S*kin *r*eactive *f*actor"), factorul de transfer etc. Ele au o importanță esențială în recrutarea altor tipuri de celule din circulație, cu rol efector direct în hipersensibilitate.

Rolul macrofagelor. Macrofagele sînt celule cu rol fundamental în procesele de imunitate mediată celular. Ele înglobează și prelucrează antigenele, asigură recunoașterea acestora prin prezentarea lor celulelor T_{H}, în asociere cu moleculele din clasa II CMH, sintetizează IL-1 care induce celulele T_{H} activate să producă IL-2, cu rol important în evoluția răspunsului imun. Ele sînt atrase în situsul inflamator și activate în urma interacțiunii cu antigenele, celulele T_{DH} și limfokinele, determinînd lezarea nespecifică a țesuturilor, fie direct, fie prin intermediul IL-1 (Crowle, 1975). Macrofagele „normale" sînt echipate numai cu o capacitate limitată de activitate bacteriostatică și bactericidă, care stă la baza rezistenței înnăscute (Nanyi, 1986).

Activarea lor prin acțiunea limfokinelor reprezintă consecința cea mai importantă și fundamentală pentru evoluția stării de hipersensibilitate. Ea conferă acestor celule o activitate fagocitară și bactericidă crescută, atît față de antigenul omolog, cît și față de alte organisme intracelulare neînrudite (Mackaness, 1968). Stimularea macrofagelor independente de celulele T la șoarecele „nud" nu mărește această activitate.

Un rol esențial joacă factorul de inhibare a migrării macrofagelor MIF („Macrophage inhibitory factor"), glicoproteină cu g.m. ~25 000 dal, care interacționează cu receptorii glicolipidici de pe suprafața celulară (David și colab., 1983). El poate fi produs și *in vitro* în culturile de celule T_{DH} stimulate cu antigenul corespunzător. La om, conține trei specii moleculare distincte, diferite ca g.m., sensibilitate la tripsină și chemotripsină etc. Aceste particularități reflectă, probabil, existența a diferite subpopulații de celule T, care produc molecule diferite, care au însă aceleași proprietăți *in vivo* (Greene, 1984). Administrarea MIF *in vivo* induce o reducere marcată a monocitelor circulante, iar injectarea lui locală determină apariția reacțiilor inflamatorii. Prezența sa în supernatantul culturilor poate fi evidențială, testată și cuantificată prin capacitatea de a inhiba sau de a suprima migrarea macrofagelor într-un tub fin de sticlă dispus vertical.

Rolul mastocitelor. Deși contestat de mulți cercetători, date mai recente probează rolul mastocitelor în hipersensibilitatea întîrziată. El s-ar exercita, la șoarece, prin intermediul serotoninei, față de care vascularizația locală este, în mod particular, sensibilă. Eliberarea ei ar fi urmată de producerea de breșe la nivelul joncțiunilor endoteliale ale venulelor postcapilare, ceea ce ar permite extravazarea celulelor circulante. Neutralizarea serotoninei cu ajutorul rezerpinei diminuă fenomenele locale de hipersensibilitate (Askenase, 1980). Eliberarea serotoninei din granulații s-ar face prin fuziune, exocitoză, dar, mai ales, printr-un proces de degranulare lentă, treptată („Piecemeal degranulation").

Interacțiuni celulare și moleculare în reacțiile de hipersensibilitate întîrziată. Preluarea și prelucrarea antigenelor către macrofage și celulele dendritice Langerhans sînt urmate de interacțiunea unui număr mic de celule T_{DH} cu celulele care prezintă antigenul, în asociere cu moleculele CMH. Fenomenul este asociat cu sinteza de IL-1 de către macrofage. Celulele T_{DH} activate sintetizează limfokine, cu o gamă largă de activități biologice. Funcția lor globală este de a amplifica reacția inițială, de a

recruta alte celule (monocite, macrofage, limfocite, neutrofile, eozinofile, mastocite), de a le activa și de a induce proliferarea unora din ele.

Factorul MIF inhibă migrarea aleatorie a macrofagelor în țesuturi și determină acumularea lor în zona celulelor T_{DH} activate.

Factorul MAF („Macrophage activation factor"), cel puțin parțial identic cu IFNγ, după unii cercetători, mărește activitatea bactericidă și bacteriolitică a macrofagelor.

O anumită limfokină induce eliberarea din monocite a unei activități procoagulante, care explică formarea unei rețele de fibrină, cu participarea sistemelor de coagulare (Wells, 1984).

Depunerea de fibrină stimulează sinteza unui activator al plasminogenului de către macrofage și formarea de plasmină, care lizează fibrina.

Celulele activate din infiltratele de hipersensibilitate întîrziată pot afecta nespecific și alte celule, diferite de cele care au indus sensibilizarea, datorită apariției unor proprietăți bactericide sau tumoricide. Pe acest principiu se bazează încercările de tratare a unor tumori care induc reacții nespecifice de hipersensibilitate cutanată (BCG, levamisol etc.).

Modularea activității celulelor T_{DH}. Rolul limfocitelor T_S. Relația dintre celulele T_{DH} și T_S este exemplificată și de evoluția infecției cu *Mycobacterium leprae*, care produce două tipuri de boală : 1) *lepra tuberculoidă*, formă limitată de boală, cu puține bacterii în leziuni, asociată cu o activitate normală sau puțin crescută a celulelor T ; 2) *lepra lepromatoasă*, cu evoluție gravă, diseminată, cu un număr mare de bacterii în piele. Absența reactivității celulelor T, demonstrată *in vivo* și *in vitro*, în cursul leprei lepromatoase a fost atribuită lipsei subpopulațiilor de celule T_{DH} reactive față de *M. leprae*. Recent s-a demonstrat că această comportare este rezultatul predominanței efectelor supresoare față de cele activatoare și nu lipsei de celule antigen-reactive.

Argumentele principale sînt următoarele : 1) în lepra tuberculoidă predomină limfocitele $T4^+$ (T_H, T_{DH}), în timp ce în lepra lepromatoasă predomină celulele $T8^+$ (T_S); 2) după îndepărtarea celulelor $T8^+$ din circulație, efectul protector anti-*M. leprae* poate fi evidențiat și *in vitro* ; 3) adăugarea de IL-2 exogenă *in vitro*, în culturile de celule provenite de la bolnavi cu lepră lepromatoasă restabilește reactivitatea normală a celulelor T. Este probabil că acțiunea supresoare a celulelor T ar interfera cu sinteza, secreția sau activitatea IL-2.

Hipersensibilitatea de contact

Reprezintă capacitatea de a răspunde hiperreactiv la aplicarea percutanată (epicutanată) a unor substanțe simple, pe pielea intactă. Manifestarea tipică la om este dermatita de contact (eczema alergică).

Antigenele sînt reprezentate de substanțe cu proveniență diferită, cu molecule mici (g.m. $<$1 000 dal), cu caracter de haptene, deci neantigenice *per se*, dar capabile să traverseze pielea intactă și să se cupleze covalent sau necovalent cu proteinele din organism. Unele sînt metale (Ni, Hg, Cr), altele, substanțe sintetizate, ca, de exemplu : bicromatul de K (utilizat în prelucrarea pieilor), coloranții utilizați în cosmetică (ruj,

farduri, vopsele pentru păr), unguentele, substanțele din cauciuc sau utilizate în tehnica foto. În sfîrșit, altele au origine naturală (bumbac și alte fibre vegetale, tomate, extracte de *Primula* etc.). Starea de hipersensibilitate se instalează după ~7 zile de la contactul cu antigenul (fig. 298).

Leziunile caracteristice sînt reprezentate de apariția unor papule eritematoase, ușor indurate, cu epidermul îngroșat, care decolează epiderma, pentru a forma vezicule, urmate de îndepărtarea stratului epidemic și ușor edem. După vindecare apar cruste și fenomene de hiperkeratoză. Microscopic, au caracterul de infiltrat cu mononucleare, care apare după 6—8 ore, ajunge maximum după 12—15 ore și poate persista în cazul formelor severe > 7 zile. Epidermul are un caracter spongios, cu stratul Malpighi îngroșat și foarte puține neutrofile.

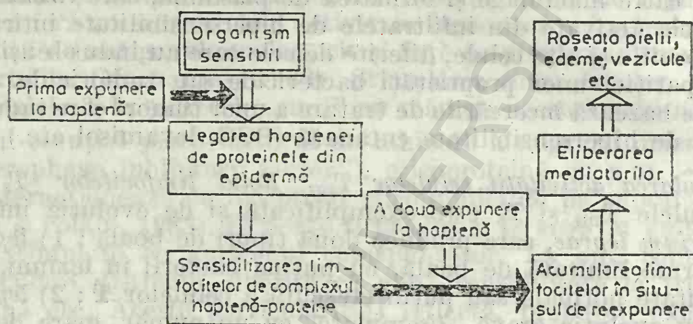


Fig. 298. — Reprezentare schematică a etapelor succesive ce duc la producerea dermatitei alergice de contact.

Natura fenomenului a fost studiată cu ajutorul sensibilizării cutanate la trinitroclor benzen (TNCB). Compusul a fost regăsit în proporție de ~85 % legat de proteinele celulelor epidermice, prin gruparea NH_2 a resturilor de lizină. Celulele care prezintă antigenul astfel format limfocitelor T sînt în special celulele Langerhans, pe suprafața cărora se găsesc numeroase molecule Ia, implicate în imunogeneză. Se apreciază, de asemenea, că granulațiile Birbeck prezente în aceste celule de tip dendritic ar avea un rol important în prezentarea antigenelor către celulele T. Celulele Langerhans, care formează în piele o adevărată rețea, datorită prelungirilor lor dendritice (fig. 130) ar fi celule mobile, recirculante, care preiau antigenele la nivelul pielii și se deplasează în ganglionii regionali, unde inițiază răspuncul imun, după interacțiunea cu celulele T.

Hipersensibilitatea de tip Jones-Mote

Reprezintă o formă cutanată de hipersensibilitate de tip întîrziat, caracterizată prin prezența în zona imediat subiacentă epidermei a unui infiltrat celular, format predominant din bazofile.

Poate fi produsă de antigene proteice solubile, antigene parazitare, alergene de contact, celule tumorale și alogenice. Sensibilizarea apare la cobai după 7 — 10 zile de la contactul inițial cu antigenul. Nu apare la toate speciile. La omul sensibilizat cu antigene proteice în soluții saline are doar caracter tranzitoriu. La cobai, sensibilizarea poate fi produsă

numai cu stimuli antigenici slabi (spre exemplu, ovalbumină (OVA) + adjuvant Freund incomplet). Acelaşi antigen asociat cu adjuvantul Freund complet produce reacţii de tip tuberculinic (cu un infiltrat celular caracteristic, cu puţine bazofile). La şoarece este absentă.

Reacţia tipică este localizată în regiunea superioară a dermului şi are caracter predominant eritematos. Tumefacţia este maximă după 24 de ore de la declanşare. În infiltrat predomină bazofilele care eliberează un activator al plasminogenului, ce controlează cantitatea de fibrină prezentă. Evoluţia este controlată de celulele T cu fenotipul Lyt-$1^{-}2^{+}3^{+}$ (T_s).

Reacţia tip de Jones-Mote diferă de tipul clasic de hipersensibilitate întîrziată şi prin alte două proprietăţi importante: 1) nu este supusă restricţiei CMH şi 2) poate fi transferată la receptori sănătoşi cu ajutorul anticorpilor şi al celulelor B (Askenase, 1973; 1980; Greene, 1984).

Hipersensibilitatea de tip granulomatos

Reprezintă, din punct de vedere clinic, forma cea mai importantă de hipersensibilitate de tip întîrziat deoarece efectele sale patologice sînt evidente într-o serie de boli determinate de procese imunitare mediate celular.

Granulomul a fost descris, de Epstein (1969), ca un tip de răspuns inflamator localizat, cu caracter complex, alcătuit predominant din celule mononucleare (macrofage), celule epitelioide şi celule gigante, care apare ca rezultat al unor stimulări cronice, produse de agenţi infecţioşi vii sau de substanţe străine (Greene, 1984). În funcţie de natura stimulilor inductori au fost descrise două tipuri de granuloame:

1) *Granuloamele imunologice* sînt determinate de agenţi infecţioşi vii, în general paraziţi intracelulari, şi de complexe imune (alveolită alergică). Au fost descrise relativ frecvent, în urma unor sensibilizări faţă de *M. tuberculosis* şi *M. leprae*. Leziuni similare au fost descrise şi în cazul unor stimuli neinfecţioşi, cum sînt cei asociaţi cu sarcoidoza sau cu alergia la zirconiu.

Modificările celulare tipice pentru granulomul imunologic sînt reprezentate de prezenţa a numeroase macrofage, localizate între fibrele ţesutului conjunctiv, asociate cu un număr variabil de limfocite, plasmocite, eozinofile, neutrofile etc. Deosebit de caracteristică este zona centrală a granulomului, formată din macrofage, celule epitelioide şi cîteva celule gigante, înconjurate la periferie de o coroană de limfocite şi, uneori, de un proces pronunţat de fibroză, determinat de prezenţa fibroblaştilor, care secretă activ colagen. *Celulele epitelioide* sînt celule mari, aplatisate, cu reticul endoplasmatic foarte dezvoltat. Celulele gigante multinucleate sînt celule de tip Langhans, cu numeroşi nuclei la periferie, cu reticul endoplasmatic puţin dezvoltat, mitocondrii rare, lizosomi cu aspecte de degenerescenţă şi cu o serie de vezicule de-a lungul membranei celulare. În unele cazuri se pot observa necroze celulare în regiunea centrală şi modificări ale arhitecturii celulare normale.

Procesul de formare a granuloamelor imunologice a fost reprodus, *in vitro*, cu ajutorul splenocitelor sensibilizate provenite de la șoareci infestați cu *Schistosoma mansoni*. S-a demonstrat că după aderarea monocitelor pe suprafața ouălor de *S. mansoni* și transformare blastică are loc un proces de recrutare a unor celule asemănătoare celor active *in vivo* : macrofage, limfocite, eozinofile și fibroblaști.

Rolul celulelor T. Rolul celulelor T_{DH} în formarea granuloamelor imunologice a fost demonstrat recent, în experiențe de stimulare persistentă cu BCG și *Corynebacterium parvum* (Greene, 1984). Ele produc limfokine, cu rol în recrutarea, diferențierea și activarea diferitelor tipuri de celule prezente în infiltrat.

2) *Granuloamele neimunologice* sînt produse, de regulă, cu ajutorul iritanților cronici, reprezentați, în general, de substanțe anorganice, cum este, spre exemplu, talcul (silicat de magneziu). Deosebirea esențială față de granulomul imunologic este reprezentată de lipsa limfocitelor din infiltrat.

Esențială pentru inducția hipersensibilității de tip granulomatos este necesitatea unei stimulări cronice, realizată de o substanță anorganică, un agent infecțios viu, un produs bacterian sau de complexe antigen-anticorp, pe care macrofagele nu le pot distruge și îndepărta.

Hipersensibilitatea stimulatoare (tipul V)

Cadrul conceptual al acestui tip de hipersensibilitate, contestat de mulți cercetători (Wells, 1984), a fost stabilit pe baza unui model molecular elaborat pentru a explica stimularea secreției hormonului tiroidian.

În mod normal, hormonul stimulator al tiroidei (HST), elaborat de hipofiză, se leagă de receptorii specifici complementari de pe suprafața celulelor tiroidiene, determinînd modificări alosterice ale acestora sau ale unor molecule adiacente, cu rol de semnal activator. Transmis în celulă, acesta activează adenilat ciclaza din membrana celulară, care mărește concentrația de AMPc și, prin intermediul acestuia, determină creșterea sintezei și secreției de hormon tiroidian. Paralel cu acest mecanism poate funcționa un al doilea, reprezentat de un *factor stimulator cu acțiune îndelungată* (LATS — „Long acting thyroid stimulator"). Acesta este un autoanticorp, aparținînd izotipului IgG, dirijat față de un antigen de pe suprafața celulei tiroidiene și capabil să mimeze acțiunea ligandului natural. El se combină cu receptorul HST sau cu o moleculă asemănătoare acestuia, inducînd modificările alosterice necesare pentru activarea adenilat ciclazei și stimulînd celula tot pe calea AMPc. Un mecanism asemănător ar funcționa și în cazul limfocitelor care au legat antigenul și un anticorp anti-Ig. Existența acestui mecanism este contestată, pe baza faptului, observat experimental, că legarea anticorpilor de celula tiroidiană, poate declanșa și alte tipuri de răspuns ca, de exemplu : 1) blocarea legării HST de receptor ; 2) creșterea excesivă a foliculilor tiroidieni, fără stimularea sintezei de hormon ; 3) blocarea activității de stimulare a creșterii

foliculare. Efectul a fost confirmat şi pentru alte tipuri de anticorpi anti-receptor (faţă de receptorii de insulină, acetilcolină, hormon de creştere, β-adrenergic etc.).

În concluzie, se poate spune că legarea anticorpilor de receptorii corespunzători de pe suprafaţa celulelor nu determină un răspuns unic, caracteristic, ci mai multe, ca, de exemplu: 1) blocarea situsului de recunoaştere a receptorului ; 2) stimularea activităţii receptorului, prin mimarea efectului ligandului natural (ca în cazul LATS) ; 3) lezarea receptorului şi/sau a celulei, fie direct, fie cu participarea complementului sau a unor celule efectoare ; 4) degradarea accelerată a receptorului ; 5) alterarea capacităţii de legare a receptorului de ligandul său natural.

Aceste date au dus la concluzia că reacţiile de tip stimulator pot fi încadrate ca o categorie aparte în tipul II de hipersensibilitate, propus de Gell şi Coombs (1968), existenţa unui tip aparte (V) fiind creată artificial.

solubare. Efectul a fost confirmat şi pentru tipul de anticorpi anti-receptor faţă de receptorii de insulină, acetilcolină, hormon de creştere, [illegible].

În concluzie, se poate spune că legarea anticorpilor de receptorii corespunzători de pe suprafaţa celulelor ţintă determină un răspuns [illegible], caracteristic, ei mai multe, ca, de exemplu: 1) blocarea stimulului de recunoaştere a receptorului; 2) stimularea activităţii receptorului, prin mimarea ligandului natural (ca în cazul LATS); 3) lezarea receptorului [illegible] direct, [illegible] cu participarea complementului [illegible]; 4) degradarea accelerată a receptorului; 5) alterarea capacităţii de legare a receptorului de ligandul său natural.

Aceste date au dus la concluzia că reacţiile de tip stimulator pot fi incluse ca o categorie aparte în tipul II de hipersensibilitate, propus de Gell şi Coombs [illegible].

[illegible] talcul (silicat de magneziu). Deosebirea esenţială faţă de granulomul imunologic este reprezentată de lipsa limfocitelor din infiltrat.

Esenţială pentru inducţia hipersensibilităţii de tip granulomatos este necesitatea unei stimulări cronice, realizată de o substanţă anorganică, un agent infecţios viu, un produs bacterian sau de complexe antigen-anticorp, pe care macrofagele nu le pot distruge şi îndepărta.

Hipersensibilitatea stimulatoare (tipul V)

Cadrul conceptual al acestui tip de hipersensibilitate, contestat de mulţi cercetători (Wells, 1981), a fost stabilit pe baza unui model molecular elaborat pentru a explica stimularea secreţiei hormonului tiroidian.

În mod normal, hormonul stimulator al tiroidei (HST), elaborat de hipofiză, se leagă de receptori specifici complementari de pe suprafaţa celulelor tiroidiene, determinând modificări alosterice ale acestora sau ale unor molecule adiacente, cu rol de semnal activator. Transmis în celulă, acesta activează adenilat ciclaza din membrana celulară, care măreşte concentraţia de AMPc şi, prin intermediul acestuia, determină creşterea sintezei şi secreţiei de hormon tiroidian. Paralel cu acest mecanism poate funcţiona un altul, reprezentat de un *factor stimulator cu acţiune îndelungată* (LATS — „Long acting thyroid stimulator"). Acesta este un autoanticorp, aparţinând izotipului IgG, dirijat faţă de un antigen de pe suprafaţa celulei tiroidiene şi capabil să mimeze acţiunea ligandului natural. El se combină cu receptorul HST sau cu o moleculă asemănătoare acestuia, inducând modificările alosterice necesare pentru activarea adenilat ciclazei şi stimulează celula tot pe calea AMPc. Un mecanism asemănător ar funcţiona şi în cazul limfocitelor care au legat antigenul şi un anticorp anti-Ig. Existenţa acestui mecanism este contestată, pe baza faptului, observat experimental, că legarea anticorpilor de celula tiroidiană poate declanşa şi alte tipuri de răspuns ca, de exemplu: 1) blocarea legării HST de receptor; 2) creşterea excesivă a foliculilor tiroidieni, fără stimularea sintezei de hormoni; 3) blocarea activităţii de stimulare a creşterii

TEORIA REȚELEI IDIOTIPICE A SISTEMULUI IMUNITAR

„Teoria rețelei sistemului imunitar a avut un impact fundamental asupra gîndirii cercetătorilor interesați în reglarea răspunsului imun și a determinat dezvoltarea unei subdiscipline a imunologiei celulare"

C. A. BONA
B. PERNIS

„Anticorpii anti-idiotip recunosc individualitatea moleculară a altor anticorpi. Ei modulează răspunsul imun și deschid calea manipulărilor experimentale și terapeutice ale sistemului imunitar"

R. C. KENNEDY
J. L. MELNICK
G. R. DREESMAN

„Prin toate mijloacele posibile, fiți atenți ! Generalizările raționale sînt o amenințare pentru ordinea acceptată"

MECHKONIK

TEORIA REȚELEI IDIOTIPICE A SISTEMULUI IMUNITAR

„Teoria rețelei sistemului imunitar a avut un impact fundamental asupra gîndirii cercetătorilor interesați în reglarea răspunsului imun și a determinat dezvoltarea unei subdiscipline a imunologiei celulare"

C. A. BONA
B. PERNIS

„Anticorpii anti-idiotip recunosc individualitatea moleculară a altor anticorpi. Ei modulează răspunsul imun și deschid calea manipulărilor experimentale și terapeutice ale sistemului imunitar"

R. C. KENNEDY
J. L. MELNICK
G. R. DREESMAN

„Prin toate mijloacele posibile, fiți atenți! Generalizările raționale sînt o amenințare pentru ordinea acceptată"

MECHKONIK

Teoria rețelei idiotipice a sistemului imunitar

„Cei care caută totdeauna să cunoască rolul presiunii externe, al agenților patogeni, pentru a explica evoluția seturilor de gene variabile, ar face bine dacă și-ar întoarce privirile spre interiorul lor înșile, pentru a descoperi aici misterul, poate niciodată dat în vileag, al sistemului imunitar".

N. K. Jerne

În acord cu teoria selecției clonale și cu cunoștințele actuale privind mecanismele genetice ale diversității anticorpilor și receptorilor limfocitari, organismele umane normale dispun, potențial, de capacitatea de a răspunde la orice substanță străină, naturală sau artificială (sintetică), datorită prezenței unui număr imens de populații de celule limfocitare, capabile să recunoască aceste substanțe, să prolifereze și să se diferențieze la celule efectoare ale răspunsului imun. În același timp, ele manifestă o toleranță perfectă față de constituenții proprii organismului respectiv. Descoperirea bolilor autoimune și a autoanticorpilor a demonstrat existența unor excepții de la această regulă, prin faptul că, în anumite condiții, anumiți constituenți proprii ai organismului pot deveni imunogeni, inducînd apariția unui răspuns imun.

Cu toate acestea, demonstrarea faptului că moleculele de imunoglobuline-anticorp poartă determinanți antigenici și că se pot comporta ca imunogene, chiar pentru organismul propriu în care s-au format, generînd formarea altor anticorpi, a fost una din descoperirile cele mai neașteptate ale ultimelor decenii. Într-adevăr, Oudin și Michel (1963), precum și Kunkel, Mannick și William (1963) au arătat că imunoglobulinele omogene, provenite de la bolnavi de mielom, injectate la animale de laborator, induc apariția de anticorpi. Antiserurile respective purificate reacționează numai cu imunoglobulina omologă, folosită ca imunogen, nu însă și cu alte proteine de mielom sau cu alți anticorpi convenționali.

Proprietățile antigenice ale anticorpilor. Aceste observații preliminare au fost confirmate de numeroase cercetări experimentale, care au demonstrat faptul, aparent paradoxal, că moleculele de Ig-anticorp poartă în structura lor mai multe tipuri de determinanți antigenici (epitopi), localizați la diferite nivele. Pe lîngă rolul important în fenomenele de recunoaștere, ei au și un rol funcțional, manifestat prin capacitatea de a induce sinteza mai multor tipuri de anticorpi. Acest rol a fost demonstrat injectînd diferite tipuri de anticorpi purificați la o serie de animale de laborator. S-a evidențiat capacitatea Ig de a induce apariția altor anticorpi la alte specii (*antiseruri xenogenice*), la aceeași specie (*aloantiseruri*) a alți membri ai aceleiași linii genetice (*izoantiseruri*) sau chiar la organismul care i-a sintetizat (*seruri antiidiotipice*).

Pe baza acestor date au fost identificate, în structura imunoglobulinelor, patru tipuri de determinanţi antigenici :

1) *Determinanţii xenotipici* sînt caracteristici imunoglobulinelor produse de o anumită specie animală şi marchează diferenţele faţă de alte specii. Prezenţa lor explică, spre exemplu, faptul că iepurele produce anticorpi faţă de Ig provenite de la şoarecii BALB/c, care sînt însă neimunogene faţă de alţi şoareci, aparţinînd aceleiaşi linii genetice.

2) *Determinanţii izotipici* sînt caracteristici diferitelor clase de Ig, în funcţie de natura catenelor grele H(μ, γ, δ, ε, α) sau a tipului de catene uşoare L (K sau λ). Sînt invarianţi ca exprimare, pe toate catenele aparţinînd unei anumite clase sau unui anumit tip, la animalele aparţinînd aceleiaşi specii, indiferent de specificitatea lor.

3) *Determinanţii alotipici* reprezintă variante antigenice ale imunoglobulinelor. Sînt prezenţi numai la unele organisme dintr-o anumită specie. Semnificaţia lor este analogă celei a antigenelor de grup sanguin, deoarece alotipul deşi variază în cadrul speciei este caracteristic tuturor tipurilor de anticorpi produşi de un anumit organism. Determinanţii alotipici sînt localizaţi în regiunile constante ale catenelor L şi H, şi ocazional numai şi în regiunile variabile (Kennedy, Melnick şi Dreesman, 1985). Natura lor nu este corelată cu specificitatea.

4) *Determinanţii idiotipici* sînt localizaţi la nivelul regiunilor variabile ale Ig şi reflectă prin natura lor particularităţile structurale specifice ale acestora (fig. 299).

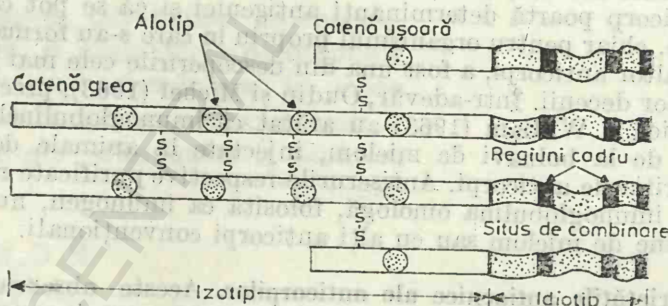


Fig. 299. — Reprezentare schematică a unei molecule de imunoglobulină, evidenţiind localizarea determinanţilor izotipici, alotipici şi idiotipici, şi a regiunilor „cadru" (după Kennedy, Melnick şi Dreesman, 1985).

Iniţial s-a considerat că prezenţa idiotopilor este limitată la moleculele de Ig libere. Ulterior s-a demonstrat că ei sînt prezenţi şi în structura diferiţilor receptori celulari de antigen. Acest fenomen este evident, în primul rînd, în cazul moleculelor de Ig legate de membrana celulelor B, care servesc ca receptor de antigen şi sînt identice cu anticorpii circulanţi produşi şi sintetizaţi de celulele respective, consideraţi de Jerne (1984) ca adevărate mesaje chimice eliberate de limfocite în mediu. Idiotopii

sînt prezenți și în structura receptorilor de antigen (Ti/T3) pe suprafața celulelor T. În felul acesta, rețeaua idiotipică nu este numai o rețea de interacțiuni moleculare (între Ig libere), ci și o rețea de interacțiuni intercelulare.

Cu toate acestea, deoarece idiotipurile imunoglobulinelor sînt mult mai mult studiate, cele mai multe descrieri se referă la interacțiunile lor idiotipice, deși datele respective pot fi, aproape în majoritate, extrapolate la idiotipurile de pe suprafața celulelor imunitare.

Conceptul de idiotip

„Idiotipul este un interpret principal al dramei biologice, un element reglator cu o imensitate de funcții posibile".

T. J. KINDT

Determinarea caracterului antigenic al anticorpilor a permis definirea conceptului de *idiotip* (gr. „idiot" =personal, distinct, individual) Termenul caracterizează ansamblul setului de determinanți antigenic individuali, prezenți pe molecule de Ig, cu aceeași specificitate, produse de o anumită clonă (subpopulație) de celule B. Fiecare determinant antigenic individual este numit idiotop (i).

Raportul dintre idiotip și idiotopi este echivalent celui dintre un antigen și fiecare din determinanții săi antigenici (epitopi) individuali.

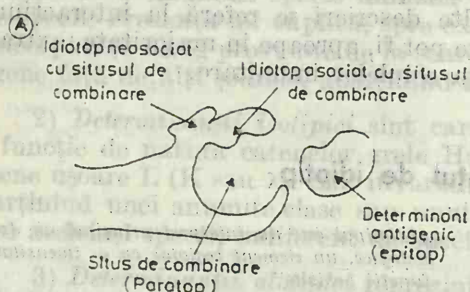
Localizările idiotopilor. Idiotipurile (Id) sînt asociate cu regiunile hipervariabile (hv) ale imunoglobulinelor, precum și cu regiunile-cadru („Framework regions") ale segmentelor Fab. În felul acesta, fiecare „braț" Fab al moleculelor de Ig prezintă un *parotop* (situs de legare a antigenului) și un set unic de *idiotopi*.

Structura idiotopilor este determinantă fie de regiunea V_H, fie de V_L, fie de o combinație rezultată din asocierea lor. Mai precis, regiunile implicate în formarea idiotopilor sînt reprezentate de segmentele Lhv 1, Lhv 2 (nu totdeauna), Lhv 3, precum și de segmentele Hhv 1, Hhv 2 și Hhv 4 (segmentul Hhv 3 este în afara paratopului) (fig. 21). Formarea determinanților antigenici idiotopici este favorizată de plierea catenelor H și L, care aduce multe segmente hipervariabile în apropiere strînsă unele cu altele, în „pereții" paratopului și de apariția pe această cale a diferitelor adîncituri și proeminențe ale structurii tridimensionale de suprafață a regiunii V (Burdette și Schwartz, 1987).

În unele cazuri idiotopii sînt localizați în interiorul situsului de legare al anticorpilor („Site-related idiotopes"), iar în altele, în afara acestuia („Non-site related idiotopes"), (fig. 300).

Determinarea situsului de localizare a unui idiotop se face prin testul de legare a haptenei sau a antigenului. Cînd idiotopii sînt localizați în situsul de legare (paratop) sau foarte aproape de el, fixarea anticorpilor din serurile antiidiotipice este blocată de expunerea anterioară la antigen.

Probabil că în acest proces, antigenul blochează legarea antiidiotipului prin „umplerea" situsului de combinare al anticorpului. În cazul idiotopilor situați în afara situsului paratop, legarea anticorpilor antiidiotipici Ac1 nu este inhibată de prezența haptenei.



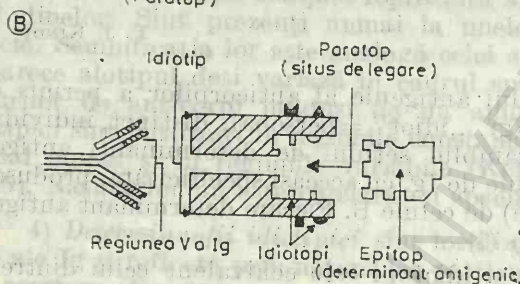


Fig.300. — Reprezentare schematică a structurii regiunii variabile a Ig, evidențiind localizarea idiotopilor și paratopilor (A) (după Paul, 1984) și relația lor cu epitopul (B) (după Roitt și colab., 1985).

În funcție de localizarea idiotopilor, în interiorul unui paratop sau în afara lui, interacțiunile dintre anticorpi au loc după tipul: paratop/paratop, paratop/non-paratop sau non-paratop/non-paratop.

Tipurile de idiotopi. În funcție de particularitățile lor de reacție au fost descrise trei tipuri de idiotopi:

1) *Idiotopii individuali* sînt cel mai frecvent întîlniți, deoarece fiecare moleculă de Ig derivă monoclonal (este produsă de o anumită subpopulație omogenă de celule B) și are o regiune V cu structură unică. În consecință, fiecare moleculă de anticorp are determinanți idiotipici unici, care îi conferă propriul său profil idiotipic sau un anumit *idiotip individual* sau *particular* („Private idiotype").

2) *Idiotopii comuni.* În cazul în care anticorpi diferiți sînt codificați de același segment al genei V_H, anticorpii pot avea *idiotopi comuni* („Public idiotopes"), chiar dacă proprietățile lor de legare sînt diferite. Idiotopii comuni pot rezulta și în urma unor mutații, care determină modificări minore în structura situsului de combinare al unor anticorpi cu specificități diferite.

3) *Idiotopii cu reactivitate încrucișată.* În unele cazuri, idiotopii derivați din gene V diferite pot avea structuri suficient de apropiate pentru a reacționa încrucișat în reacțiile serologice („Cross-reactive idiotopes").

Semnificația idiotopilor. Idiotopii pot fi considerați ca markeri ai regiunii V a imunoglobulinelor sau ai receptorilor de antigen, în general. Ei le conferă acestora caracterul de individualitate. Ca urmare, Ig cu o anumită specificitate au idiotopi identici, în timp ce anticorpii cu specificități diferite produși de același organism au idiotopi diferiți.

Fenomenul de idiotipie revelă existența unor constituenți self care sînt antigenici pentru organismul în care se găsesc în calitate de constituenți normali (în cazul receptorilor celulari de antigen) sau în care au fost produși (în cazul anticorpilor formați în cursul răspunsului imun). Anticorpii induși sub acțiunea idiotopilor și capabili să se combine specific cu aceștia se numesc *anticorpi antiidiotipici*. La rîndul lor, ei poartă alți idiotopi, capabili să inducă formarea altor anticorpi, *anti-antiidiotipici*.

Ca urmare, distincția dintre idiotip și antiidiotip este pur operațională. Orice idiotop de pe suprafața unui receptor de antigen (imunoglobulina liberă sau legată de celulele B, receptor T) poate funcționa în același timp ca imunogen (epitop), pentru a induce un răspuns imun umoral sau celular, sau ca paratop, pentru a se lega de un alt idiotop complementar. În acest context, denumirea unui membru al acestei perechi ca antigen și a celuilalt ca anticorp este lipsită de sens, exceptînd cazul cînd sînt folosiți în experiențe de imunizare.

Repertoriul idiotipurilor. Ideea existenței unui repertoriu idiotipic cu dimensiuni enorme, a fost sugerată de Oudin și Cazenave (1971), precum și de Linch (1972).

Acest punct de vedere a fost confirmat de Nisonoff (1974), care a demonstrat că un idiotip dat este extrem de rar întîlnit în gamaglobulinele serice ale animalelor normale.

După Jerne (1974, 1985), întrucît idiotipurile sînt markeri genetici ai regiunilor variabile ale globulinelor, ele trebuie să fie, în mod necesar, la fel de diferite ca și situsurile de legare ale acestora.

Practic deci, milioanele de subpopulații de celule T și B, precum și miliardele de molecule de anticorpi, prezente în repertoriul disponibil al sistemului imunitar, poartă un număr de idiotipuri diferite egal cu cel a capacităților lor specifice de recunoaștere. Aceasta face ca teoretic, în sistemul imunitar al unui organism dat, fiecare idiotop să poată fi recunoscut de un set de paratopi și fiecare paratop să poată recunoaște un set de idiotopi.

Teoria rețelei idiotipice a sistemului imunitar

Formulată de Jerne (1974), această teorie are la bază ideea că într-un organism animal fiecare moleculă de anticorp este recunoscută de situsurile combinante de pe alte molecule de anticorp. În mod asemănător, idiotopii de pe moleculele de receptori ai unui limfocit sînt recunoscuți de situsurile combinante ale receptorilor altui set de limfocite diferite. Se formează astfel o rețea de celule și de molecule care recunosc alte limfocite și imunoglobuline și acestea, la rîndul lor, le recunosc pe altele.

În formularea teoriei rețelei, Jerne a pornit de la următoarele premise, susținute de un puternic suport experimental:

1) descoperirea determinanților idiotipici și definirea conceptului de idiotipie;

2) evidențierea diversității enorme a situsurilor de legare a antigenelor prezente la animale, materializată prin numărul imens de limfocite, care poartă receptori pentru un număr egal de antigene cu care pot veni în contact. Coroborate, aceste date au dus la ideea că moleculele de anticorpi și receptorii limfocitari de antigen, care recunosc epitopii străini, sînt, la rîndul lor, recunoscuți de alte molecule de anticorpi sau de receptori, din cauza determinanților idiotipici de pe suprafața lor;

3) existența unui dualism al sistemului imunitar materializat prin prezența a două seturi majore de limfocite (T și B) și prin capacitatea lor de a funcționa fie sinergic, fie antagonic;

4) demonstrarea rolului crucial al supresiei în funcționarea răspunsului imun.

Modelul propus inițial de Jerne (fig. 301) presupune că idiotopul și paratopul sînt două entități cu localizări separate. În această alternativă, idiotopul unei molecule A (moleculă de anticorp sau receptor celular de antigen) „se potrivește" în paratopul unei a doua molecule B. La rîndul său, idiotopul moleculei B „se potrivește" în paratopul unei a treia molecule C ș.a.m.d. Se creează astfel o rețea funcțională de idiotopi și de paratopi, în cadrul căreia se pot produce o serie de interacțiuni cu potențial de autoreglare. Întrucît fiecare idiotip este alcătuit din mai mulți idiotopi, capabili să interacționeze cu antiidiotopii complementari, rețeaua își extinde structura sa complexă în multe direcții, în așa fel încît recunoașterea mutuală a idiotopilor determină o permanentă comunicare între elementele sistemului imunitar (UytdeHaag și colab., 1986).

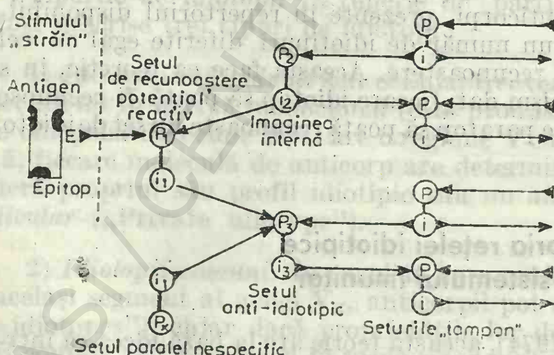


Fig. 301. — Teoria rețelei idiotipice a sistemului imunitar. Schema originară a lui Jerne (1974).

Modelul originar (fig. 301) sugerează în același timp structura și modificările ce intervin în rețeaua idiotipică după pătrunderea unei substanțe antigenice care poartă epitopul E. Antigenul preluat, prelucrat și „prezentat" de macrofage este recunoscut, cu diferite grade de precizie,

de un set de paratopi situați nu numai în structura moleculelelor de Ig libere, ci și pe receptorii de antigen ai celulelor B (imunoglobulinele de pe suprafața membranei) și ai celulelor T (complexul Ti/T3) preexistente în sistem, specifice epitopului respectiv. Setul inițial de situsuri de combinare numit P1 (de la paratop) este asociat cu un set de idiotopi notat i1. Acronimul P1i1(E) caracterizează setul total de molecule de Ig sau de receptori limfocitari specifici pentru epitopul E. El reprezintă setul de recunoaștere specific și de răspuns la acest epitop. Presupunînd că paratopii P1 sînt purtați de o subpopulație de limfocite B, legarea determinanților antigenici E este urmată de stimularea, proliferarea și diferențierea lor la plasmocite. Acestea sintetizează și secretă anticorpii specifici corespunzători (Ac1), capabili să se combine cu epitopii E. Reacția astfel produsă este cunoscută sub denumirea de *răspuns imun primar*.

Pe lîngă capacitatea de a recunoaște antigenul străin, fiecare paratop din setul P1 recunoaște un set mai mare de idiotopi i2. Aceștia reprezintă un fel de „imagini interne" ale epitopului E, prezente în structura sistemului imunitar, pentru că sînt recunoscute de aceeași populație de paratopi (P1), care recunoaște epitopul E. Setul de idiotopi i2 este asociat cu un set de paratopi P2, care sînt prezenți în structura moleculelor de Ig și a receptorilor celulari ce aparțin setului P2i2 (E).

În același cadru, fiecare idiotop al setului P1i1 este recunoscut de un set mai mare de paratopi P3, care sînt prezenți împreună cu idiotopii i3 pe anticorpii și pe limfocitele din organism, ce aparițin setului P3i3 (E). În sfîrșit, setul de idiotopi i1 este recunoscut și de un set de paratopi P3, care reprezintă un set de anticorpi antiidiotipici.

Teoria prevede că, în afară de setul de recunoaștere dotat cu capacitatea potențială de a produce un răspuns imun în prezența epitopului E, există un *set* numit *paralel nespecific*. Acest set, notat i1Px prezintă idiotopii setului i1, în asociere moleculară cu situsuri de legare (paratopi), care nu „se potrivesc" cu epitopul străin. Modelul demonstrează modul în care progresiv se ajunge la seturi tot mai mari de paratopi și de idiotopi, care recunosc sau sînt recunoscuți de seturi anterior definite în rețea. După ce a fost declanșat, răspunsul imun față de epitopul E, este modulat de efectele mai multor situsuri de legare (P) și de idiotopi (i), care alcătuiesc *seturile tampon* („Buffering sets"), ce controlează intensitatea răspunsului imun.

Pe baza interacțiunilor posibile după modelul originar, Jerne emite unele ipoteze privind funcționarea rețelei idiotipice. El consideră că în figura 301 cînd idiotopii sînt recunoscuți de paratopii de pe celulele receptoare, săgețile indică un efect stimulator și respectiv un efect supresor, cînd paratopii recunosc idiotopii de pe celule.

În consecință, elementele ce aparțin setului P2i2(E) („imaginea internă" a epitopului) sînt în mare măsură stimulatoare față de setul P1i1(E) de limfocite potențial reactive. Invers, componenții setului antiidiotipic, P3i3(E), sînt în mare măsură inhibitori. În mod normal, interacțiunea acestor forțe determină o supresie echilibrată a sistemului imunitar. Pentru a produce un răspuns imun față de epitopul E, această stare trebuie învinsă prin declanșarea unor interacțiuni de tip nou.

Starea normală a sistemului imunitar. Ipoteza lui Jerne pornește de la premisa că sistemul idiotipic, respectiv interacțiunile celulare și moleculare din rețea, au loc nu numai cînd sistemul imunitar este provocat de un antigen străin (starea imună), ci și în cursul stării neimune („Non-immune state"), de echilibru.

Ca urmare, în mod normal, sistemul imunitar este prezent în organism sub forma unei rețele enorme de paratopi, care recunosc seturi de idiotopi, și a unei rețele de idiotopi, care recunosc seturi de paratopi. În acest cadru, numeroasele clone limfocitare care recunosc prin intermediul paratopilor lor epitopii străini și determinanții antigenici self sînt, la rîndul lor, recunoscute de alte clone de celule, prin intermediul idiotopilor lor. În felul acesta, sistemul imunitar apare, în mod normal, ca format din perechi de clone, care interacționează preferențial (Bona, 1986).

Pe această cale se realizează un număr imens de conexiuni idiotip/antiidiotip, care creează în ansamblu o rețea funcțională de molecule solubile și de receptori limfocitari ce asigură controlul intern al răspunsului imun, atît în mod normal, cît și după pătrunderea antigenelor străine. Presupunînd că într-un organism ar exista un set de 10^7 situsuri de combinare, fiecare membru al acestui set va recunoaște mai mulți membri ai setului egal de 10^7 idiotipuri. În același timp, fiecare membru al setului de 10^7 idiotipuri va fi recunoscut de mai mulți membri ai setului de 10^7 situsuri de combinare.

Caracterul normal de rețea decurge din faptul că fiecare moleculă de anticorp (sau receptor) din sistemul imunitar este, în același timp, purtătoarea unui idiotop (cu rol de determinant antigenic sau de epitop), dar poate funcționa și ca anticorp antiidiotipic față de moleculele de anticorpi (sau receptori) prezenți în același sistem.

Prin intermediul acestor interacțiuni antigen — anticorp neașteptate, sistemul imunitar interacționează cu el însuși (Kennedy, Melnick și Dreesman, 1980). Consecința acestor interacțiuni este starea normal supresată a sistemului imunitar normal. În sprijinul existenței acestei stări, Jerne (1974) aduce o serie de argumente de ordin cantitativ. Astfel, la șoarece în absența unui stimul antigenic, concentrația moleculelor de Ig în sînge este de $\sim 5 \times 10^{16}$/ml. Aceasta corespunde la o concentrație de paratopi și de idiotopi de 10^{17} situsuri per ml. Presupunînd că fiecare animal exprimă 10^7 idiotopi, fiecare idiotop se va găsi în ser într-o concentrație de 10^{10}/ml. Or, studiile anterioare referitoare la toleranța de zonă joasă (Ada și Parish, 1968) au arătat că, în general, concentrațiile de epitopi cuprinse între 10^6 și 10^{12} situsuri/ml sînt capabile să supreseze activitatea limfocitelor, care poartă receptori specifici pentru epitopii respectivi.

Un aspect fundamental al teoriei rețelei este, după Jerne (1984), că în absența antigenelor interacțiunile din sistemul imunitar normal creează o *stare de echilibru* („Steady-state") în cadrul căreia rețeaua idiotipică funcționează ca un întreg, într-un mod particular, caracteristic. El are, după Jerne, „Eigen-behaviour" * (germ. „Eigen" = particular, specific, caracteristic pentru; engl. „Behaviour" = comportament) reali-

* Termenul „Eigen-behaviour" este folosit prin analogie cu conceptele de „eigen-value" sau de „eigen frequency" ale unor sisteme fizice.

zat prin intermediul interacțiunilor interne ale elementelor componente proprii. În cadrul lor, după cum s-a demonstrat experimental, celulele B pot fi stimulate să sintetizeze cantități mici de anticorpi, chiar în absența antigenelor din organism. Fenomenul, aparent paradoxal, a fost explicat odată cu descoperirea unei populații de celule T_H specifice pentru idiotip (și nu pentru antigen). Ele activează celulele B *in vitro* în absența antigenului. Concentrațiile mici de anticorpi sintetizați pe această cale au un rol important în producerea unor cantități mici de idiotipuri, care asigură menținerea unei stări constante de echilibru, în absența antigenului. În felul acesta, sistemul imunitar este, în principal, concentrat către sine-însuși („Self-centered") pentru a produce anticorpi antiidiotipici față de proprii săi anticorpi, care reprezintă majoritatea antigenelor din organism. El poate fi conceput deci ca o rețea de interacțiuni independente de antigenele străine, în care toți componenții săi sînt într-o comunicare permanentă și echilibru mutual datorită semnalelor pozitive și negative din interiorul sistemului. Consecința acestor interacțiuni este starea normal supresată a sistemului imunitar. Declanșarea unui răspuns imun implică învingerea acestei stări de supresie prin perturbarea echilibrului normal al rețelei.

Argumente experimentale în favoarea teoriei rețelei idiotipice

Primele dovezi experimentale privind existența unei rețele funcționale idiotipice într-un sistem imunitar individual au fost aduse de Rodkey (1974). El a imunizat un lot de iepuri cu un anumit antigen și a purificat anticorpii specifici produși. După o perioară de 14 luni, în care animalele au fost lăsate în repaus, fiecare iepure a fost reinjectat cu o cantitate de anticorpi produși inițial de el însuși. În felul acesta, a demonstrat prin teste radioimune caracterul antigenic al anticorpilor produși, manifestat prin apariția de anticorpi anti-anticorpi.

Confirmînd aceste date, Bona (1982) a demonstrat caracterul extensiv al rețelei idiotipice la șoarece. Folosind un antigen glucidic bacterian, cu un idiotip caracteristic, a indus sinteza și secreția unor anticorpi specifici (Ac1). Acești anticorpi, izolați și injectați la un animal din aceeași linie genetică, determină producerea de anticorpi față de idiotipul prezent în structura lor. La rîndul lor, acești anticorpi (Ac2), izolați și reinjectați la un alt animal, declanșează sinteza altor anticorpi (Ac3) ș.a.m.d. Acești anticorpi diferiți coexistă în organismul unui singur animal, ceea ce demonstrează existența unei rețele de recunoaștere idiotipică proprie oricărui sistem imunitar, care leagă regiunile variabile ale receptorilor de antigen.

Urbain și colab. (1983) au confirmat aceste date și au analizat și definit primele seturi de anticorpi ce apar secvențial în rețeaua idiotipică. Cînd un antigen străin pătrunde în sistem, efectul său stimulator asupra setului de celule care îl recunosc („Setul de recunoaștere") permite acestora să scape de supresia normală. Celulele B stimulate clonal proliferează și se diferențiază la plasmocite, care sintetizează anticorpi specifici față de antigenul respectiv. Acești anticorpi, notați Ac1, poartă idiotipul de tip

1(il). Sub influența lor, respectiv a semnalelor idiotipice, celulele B sintetizează o nouă categorie de Ig, notată Ac2, de anticorpi antiidiotipici. În continuare, are loc producerea de Ac3, sub forma unei populații diverse de anticorpi anti-antiidiotipici și de anticorpi de tip Ac4 sau anti-anti-antiidiotipici, produși față de Ac3. Ei au capacitatea de a recunoaște determinanți comuni între Acl și Ac3.

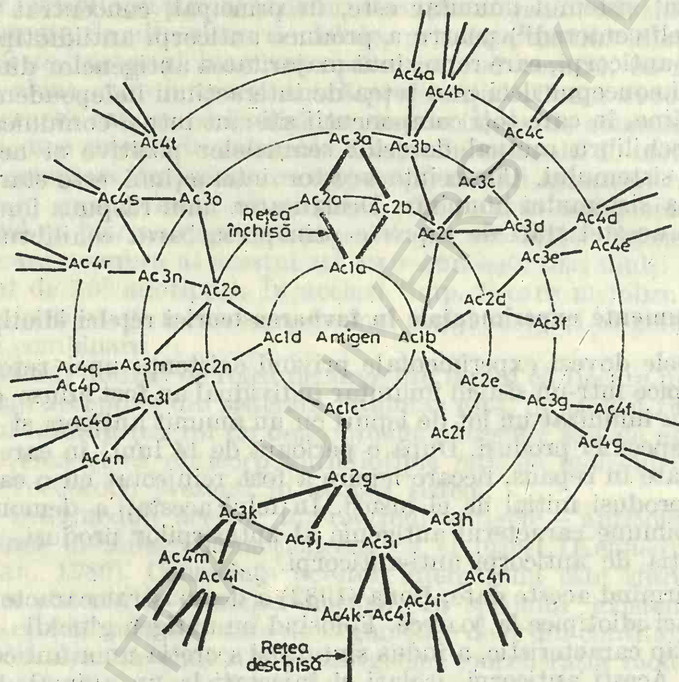


Fig. 302. — Reprezentare schematică a capacității potențiale de expansiune a răspunsului imun, prin valuri succesive ale unei rețele idiotip — antiidiotip. Rețeaua poate fi complet deschisă, și prin aceasta în expansiune (partea inferioară a figurii), sau închisă (partea superioară) (după Hood și colab., 1984).

Aceste date demonstrează că efectele declanșate de un antigen reverberează în întregul sistem imunitar, propagîndu-se într-un mod asemănător undelor formate pe suprafața unei ape liniștite, sub impactul unui șoc, pînă cînd ajung la o nouă stare de echilibru. Anticorpii produși în valurile succesive (antigen → anticorpi Ac1 → anti-anticorp → anti-anti-anticorp → anti-anti-anti-anticorp ș.a.m.d.) creează o cascadă de interacțiuni, care potențial poate implica întregul sistem imunitar. Rețeaua poate fi deschisă și deci capabilă de expansiune sau închisă (fig. 302).

Tipurile de anticorpi antiidiotipici

Pe baza proprietăților lor imunochimice și funcționale (respectiv pe baza naturii idiotipurilor recunoscute și a efectelor lor), anticorpii anti-idiotipici (Ac2) pot fi clasificați în următoarele grupuri (Jerne și Cazenave, 1982; Bona și Köhler, 1984):

1) *Anticorpii anti-Id Ac2α* recunosc și se leagă prin paratopul lor de un idiotop localizat în regiunea „cadru" („Framework region") a anticorpului Ac1 sau de idiotopi ai receptorilor de antigen de pe celulele T sau B. Întrucît idiotopii recunoscuți nu sînt strîns asociați cu paratopul Ac1, legarea unei haptene de acesta nu poate inhiba legarea moleculei de anticorp Ac2α de un astfel de idiotop (fig. 303 A).

2) *Anticorpii anti-Id Ac2γ* reprezintă o subclasă de Ac2α, ai căror paratopi reacționează cu idiotopi localizați în paratopul Ac1 sau foarte apropiați de structura acestuia (fig. 303 B). Ca urmare, legarea lor de idiotopul Ac1 este inhibată în prezența unei haptene, care blochează specific situsul de legare al Ac1 (Bona și Köhler, 1984).

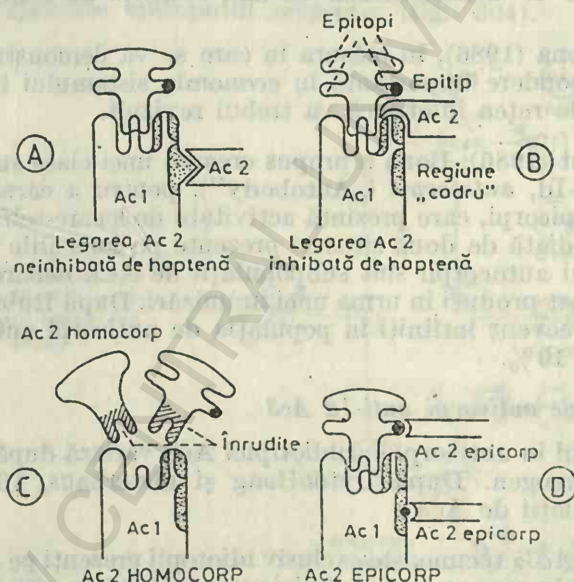


Fig. 303. — Diferitele tipuri de anticorpi antiidiotip (Ac2) (după Bona, 1985).

Separarea lor ca o categorie aparte este justificată de faptul că, în testele de legare („Binding tests"), ei mimează comportarea anticorpilor Ac2β, a căror legare de idiotopi este, de asemenea, inhibată de haptene. Legarea Ac2α și Ac2γ de celule poate avea același efect, dacă sînt administrate în doze mari, respectiv de a produce supresia răspunsului în anticorpi.

3) *Anticorpii anti-Id Ac2β* poartă determinanți idiotipici care mimează structura tridimensională a antigenelor. De aceea, Lindenman

(1971) le-a dat denumirea de *homocorpi* („Homobody"). Datorită acestei particularități, Ac2β sînt capabili să se lege, ca și antigenul, de paratopii Ac1 sau ai receptorilor de antigen de pe celulele T sau B. Deoarece pot înlocui antigenul extern în inducția unui răspuns imun specific, Ac2β sînt considerați ca *imaginea internă a epitopilor*. Ei pot mima structura antigenelor străine, prezente pe suprafața diferiților agenți patogeni, cum sînt virusurile, bacteriile, protozoarele etc., sau a unor substanțe biologic active (fig. 303 C).

4) *Anticorpii anti-Id Acε* au fost caracterizați ca o categorie de anticorpi capabili să recunoască atît determinanții antigenici prezenți pe antigenele convenționale, cît și un idiotop din structura anticorpilor produși față de ele (respectiv de epitopii lor). Au fost denumiți *epicorpi* („Epibody") și redefiniți recent (Bona, 1986) ca o categorie de anticorpi anti-Id multispecifici și ca o imagine a interrelațiilor clonale, caracteristice rețelei idiotipice, într-un singur paratop (fig. 303 D).

S-a demonstrat că o bună parte din crioglobulinele (care precipită spontan la rece) prezente în artritele reumatismale fac parte din această categorie, ceea ce demonstrează că unii epicorpi au funcție de factori reumatoizi.

După Bona (1986), în măsura în care se va demonstra că epicorpii (Ac2ε) au o pondere importantă în economia sistemului imunitar, conceptul clasic de rețea idiotipică va trebui revizuit.

5) Recent (1986), Bona a propus crearea unei clase suplimentare de anticorpi anti-Id, *autocorpii* („Autobody"), pentru a caracteriza o subpopulație de epicorpi, care prezintă activitate de legare-self. Această activitate este mediată de două situsuri prezente pe domeniile variabile. Atît epicorpii, cît și autocorpii sînt subpopulații de Ac2, deoarece se leagă de Ac1, care au fost produși în urma unei imunizări. După Rubinstein (1985), Ac2 nu sînt frecvent întîlniți în populația de anticorpi antiidiotipici. Ei ar reprezenta 10%.

Tipurile de anticorpi anti-Id Ac3

Răspunsul în anticorpi antiidiotipici Ac3 variază după tipul de Ac2 utilizat ca imunogen. După UytdeHaag și Østerhaus, 1985, ar exista patru subpopulații de Ac3:

1) *Tipul Ac3α* recunoaște exclusiv idiotopii prezenți pe Ac2 (fig. 304). Nu are idiotopi în comun cu Ac1 și nici nu manifestă specificitate de legare cu epitopii, similară celei a Ac1. Au fost caracterizați de UytdeHaag (1986), ca fiind [Ig^-Ag^-].

2) *Tipul Ac3β* are idiotopi în comun cu Ac1, dar nu leagă antigenul. Sînt [Ig^+Ag^-]. Este, în general, predominant cantitativ în cursul răspunsului la AcId2.

3) *Tipul Ac3γ* are idiotopi în comun cu Ac1 și leagă aceiași epitopi ca și aceștia. Este deci [Id^+Ag^+]. Anticorpii anti-IdAc3 α, β și γ sînt produși prin utilizarea Ac2 ca imunogen.

4) A patra subpopulaţie de Ac3 corespunde anticorpilor *anti-anti-antiidiotipici* şi este indusă de Ab2 β („imaginea internă"). Este reprezentată de anticorpi capabili să lege antigenul, să recunoască determinanţi comuni între Ab1 şi Ab3, dar care nu au în mod obligatoriu determinanţi comuni cu Ac1.

„Imaginea internă" a antigenului

Teoria reţelei idiotipice introduce un concept nou, cel de „imagine internă" a antigenului, deosebit de important atît din punct de vedere teoretic, cît şi din cel al consecinţelor practice potenţiale. Existenţa ei a fost formulată ipotetic de Jerne, încă din anul 1974. Ulterior, o serie de studii au confirmat această presupunere. Astfel, s-a demonstrat că în cazul în care paratopul şi idiotopul sînt strîns apropiaţi sau, mai ales, localizaţi în aceeaşi regiune pe molecula de Ig-anticorp, antiidiotipurile pot avea o structură globală similară celei a epitopului antigenului extern. Decurgînd din aceasta, anticorpii antiidiotipici pot lega anticorpi care poartă situsuri de combinare specifice epitopului respectiv (fig. 304).

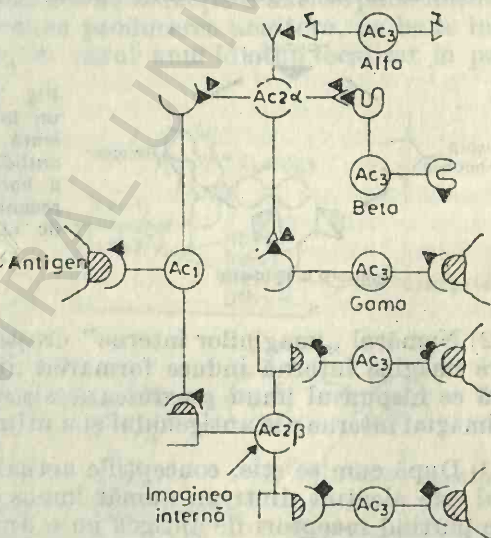


Fig. 304. — Seturile de anticorpi implicaţi în reţelele idiotipice (după Jerne, 1974).

Conceptul de imagine internă este uşor de înţeles, dacă considerăm că paratopul (situsul de legare) anticorpului (Ac1) produs de un epitop (E) este imaginea negativă a acestuia. Dacă idiotopul i1 este legat de acest situs-imagine negativă, anticorpul antiidiotipic Ac2, produs sub acţiunea lui, va fi imaginea pozitivă a paratopului Ac1 şi, ca urmare, va reproduce imaginea epitopului originar.

Denumirea de imagine internă a antigenelor acordată anticorpilor anti-Id Ac2 β derivă din faptul că ea este prezentă şi generată de sistemul imunitar însuşi, spre deosebire de antigen (imaginea externă), care are origine exogenă. Datele actuale pledează pentru ideea că anticorpii-

imagine internă reprezintă doar o minoritate în sistemul imunitar (fiind de aproximativ o sută de ori mai puțin numeroși decît anticorpii care, recunosc antigenul). Această particularitate este datorată faptului că în mare măsură, localizarea idiotopilor nu coincide totdeauna cu paratopul. De aceea, în marea lor majoritate, anticorpii antiidiotipici nu mimează efectele antigenului originar.

Consecințe teoretice și practice ale conceptului de imagine internă

1) Una dintre consecințele majore ale existenței anticorpilor „imagine internă" este legată de faptul că idiotopii clasei de Ac2 β pot simula structura tridimensională și funcțiile antigenelor. Deși cele două molecule sînt complet diferite din punct de vedere chimic, ele pot interconecta aceiași receptori limfocitari.

După cum au demonstrat Sege și Paterson (1978), anticorpii anti-Id2βAc produși sub acțiunea Ac1 pentru insulină sînt capabili să lege receptorul specific de pe membrana plasmatică a celulelor corespunzătoare mimînd efectele hormonului (fig. 305). Aceste date au dus în mod logic la ideea posibilității utilizării Ac2 β (purtători ai imaginii interne), ca *surogat de antigen* („Surrogate antigen"), pentru producerea de anticorpi protectori, în locul utilizării unui vaccin convențional.

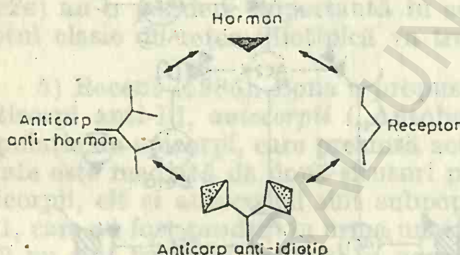


Fig. 305. — Anticorpul produs față de un hormon are o conformație echivalentă receptorului celular. Anticorpul antiidiotip poartă „imaginea internă" a hormonului și, în consecință, poate recunoaște receptorul și se poate lega de el, mimînd acțiunea hormonului.

2) Numărul „imaginilor interne" crește în cursul răspunsului imun. Fiecare imagine internă induce formarea unor antiimagini interne și pe măsură ce răspunsul imun progresează sistemul imunitar produce alternativ imagini interne ale antigenului și a ntiimagini interne ale lui.

3) După cum se știe, concepțiile actuale admit că sistemul imunitar normal este alcătuit dintr-un număr imens de subpopulații de limfocite, fiecare purtînd receptori de antigen cu o anumită specificitate, în așa fel încît, în ansamblu, poate recunoaște orice antigen teoretic posibil. În acord cu această concepție, devine evident că imaginile interne ale diferiților epitopi sînt, la rîndul lor, preexistente în rețea. În plus, aceasta înseamnă că nici un epitop din mediul extern nu este realmente străin, deoarece toți epitopii capabili să inducă un răspuns imun sînt reprezentați în sistem, prin imaginea lor internă, înainte de stimularea antigenică.

4) Acceptarea ideii că fiecare idiotip din structura sistemului imunitar normal este imaginea internă a unui anumit motiv antigenic duce cu necesitate la concluzia că unii idiotopi sînt imaginea internă a unor compuși self, deci a unor autoantigene. Aceasta a determinat ipoteza, validată

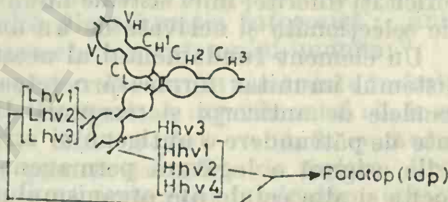
de o serie de observații, că perturbarea rețelei idiotipice poate sta la baza producerii unor boli autoimune.

5) Pe plan general, universul idiotipurilor asigură continuitatea între self (repertoriul moleculelor proprii organismului), care sînt perfect tolerate de sistemul său imunitar și universul antigenelor nonself străine, din mediu, față de care reacționează cu intensitate (Bona, 1986).

Inducția anticorpilor antiidiotip

Analizînd strategiile de producere a anticorpilor anti-Id, prin interacțiuni idiotip/antidiotiidiotip, consecutive stimulării rețelei cu anticorpi monoclonali utilizați ca imunogen, McCullough (1986) a arătat că rezultatele sînt în funcție de poziția topografică a idiotipului inductor pe moleculele de anticorpi. Stimularea rețelei idiotipice apare numai cînd idiotopii ajung în concentrații imunogene, respectiv cînd anticorpii care îi poartă sînt produși în cantități mari, ca, de exemplu, în cursul răspunsului imun activ sau după inocularea unor doze imunogene de anticorpi monoclonali (în general, 100 μg pentru animalele mici de laborator). Anticorpii antiidiotip sînt produși cel mai eficient utilizînd catene H și L asociate, deși, ocazional, au fost folosite și catene izolate.

Fig. 306 prezintă cele două căi de inducție a anticorpilor antiidiotip, ce pot acționa independent pentru producerea acestora, pe baza interacțiunilor idiotip — antiidiotip, în cazul unui idiotop localizat în paratop (Idp):



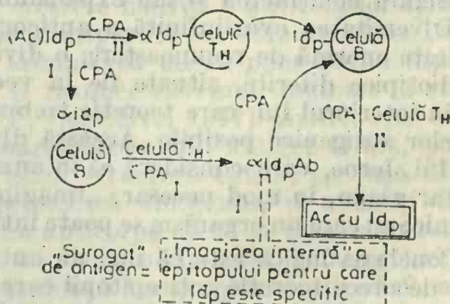


Fig. 306. — Interacțiunile idiotip/antiidiotip asociate cu regiunile idiotipice ale paratopului (Idp) și producerea anticorpului „imagine internă" activ ca „surogat deantigen" (după McCullough, 1986).

1) Prima cale este inițiată cînd Idp este injectat (sau produs) în concentrații imunogene și are ca mecanism stimularea celulelor B, care poartă antiidiotipul corespunzător. Acestea, în prezența celulelor care prezintă antigenul (CPA) și a limfocitelor T_H specifice, se diferențiază și produc

anticorpi anti-Idp. Acești anticorpi reprezintă imaginea în oglindă a paratopului inductor. La rîndul său, paratopul anticorpului anti-Idp trebuie să fie conformațional similar epitopului cu care se combină anticorpul ce poartă Idp.

2) În cea de-a doua cale, pentru stimularea limfocitelor B, care poartă Idp, este necesar ca, în general, Idp inductor să fie prezentat de macrofage (sau de celulele care prezintă antigenul) limfocitelor T_H, care poartă anti-Id. Acestea, la rîndul lor, stimulează diferențierea celulelor B, prin reacții Id/anti-Id. Această cale nu utilizează direct anticorpi din categoria „imagine internă" sau surogat de antigen (Mc Culough, 1986).

Semnificația teoretică și practică a rețelei idiotipice a sistemului imunitar

Teoria rețelei idiotipice este una dintre cele mai novatoare teorii ale biologiei contemporane și, în același timp, prima teorie unificatoare a imunobiologiei moderne. Esențială pentru înțelegerea funcționării sistemului imunitar, ea permite abordarea acestuia ca un sistem global, care este organizat, se dezvoltă, funcționează și evoluează ca un întreg. În felul acesta, este infirmat demersul reducționist al imunologiei clasice, care considera sistemul imunitar ca o colecție de clone (subpopulații) celulare, cu specificități diferite, mici sisteme imunitare independente, care „așteaptă" să fie selecționate și activate de un anumit antigen străin.

Un element fundamental al acestei teorii este reprezentat de ideea că sistemul imunitar formează o rețea funcțională de interacțiuni între moleculele de anticorpi și receptorii limfocitari, continuu reechilibrată, înainte de pătrundere a antigenului străin. Prin aceste interacțiuni, idiotipurile asigură o legătură permanentă între limfocite, precum și între limfocite și alte celule ale organismului, stimulînd pe unele, represînd pe altele, furnizînd sistemului imunitar un ansamblu de semnale interne, care asigură menținerea și/sau expansiunea clonelor limfocitare.

Diversitatea cvasiinfinită a anticorpilor creează *per se*, pe lîngă o capacitate enormă de recunoaștere, o diversitate egală de motive structurale idiotipice diferite, situate fie în vecinătatea situsului de legare fie chiar în interiorul lui, care teoretic trebuie să includă inventarul tuturor motivelor antigenice posibile. Această diversitate enormă face plauzibilă ideea lui Jerne, care consideră că în ansamblul idiotipurilor din sistemul imunitar găsim, în mod necesar, „imaginea internă" a tuturor motivelor antigenice cu care un organism se poate întîlni în cursul existenței sale.

Concluzia logică este că nici un antigen (epitop) nu este realmente străin, deoarece teoretic toți epitopii care pot declanșa un răspuns imun sînt reprezentați în sistemul imunitar prin imaginea lor internă, înainte de pătrunderea antigenului în organism.

Ilustrînd această concepție, Jerne (1984) compară sistemul imunitar cu o sală de oglinzi („A hall of mirrors"), în care sînt reflectate structuri self, antiself și, în continuare, anti-antiself și anti-anti-antiself ș.a.m.d.,

care, la rîndul lor, reflectă universul antigenelor externe. Acest punct de vedere are drept corolar ideea că răspunsul imun poate fi considerat ca expresie a evenimentelor ce urmează unei perturbări a echilibrului dinamic al acestor constituenți, sub acțiunea unor stimuli interni sau externi. Această perturbare este temporară deoarece, datorită capacității de autoreglare, este compensată prin revenirea elementelor componente ale rețelei la o nouă stare de echilibru.

Teoria rețelei explică și particularitățile individuale de dezvoltare a sistemului imunitar. Pe parcursul dezvoltării ontogenetice, ca și în cursul vieții unui organism se formează noi idiotopi și noi situsuri de legare (paratopi). În același timp, epitopii self ai diferitelor țesuturi vin în contact cu constituenții rețelei, făcînd ca unele elemente constitutive ale acesteia să devină mai numeroase, iar altele mai puțin numeroase. În felul acesta, fiecare organism dezvoltă un sistem imunitar diferit. Final, interacțiunile din rețea sînt modulate de antigenele străine, invadatoare.

Rolul rețelei idiotipice în reglarea răspunsului imun

Descoperirea idiotipurilor și a calității lor de antigene demonstrează existența în fiecare organism a unui răspuns „autoimun" specific pentru anumite regiuni ale receptorilor imunitari și ale moleculelor de imunoglobuline, considerate anterior capabile să interacționeze numai cu antigenele străine. Aceste reacții limitează și reglează exprimarea cantitativă a răspunsului imun și, ca urmare, fac parte integrantă, benefică, a răspunsului imun global. Rolul de reglare al rețelei a fost presupus de Jerne în formularea ipotezei sale, după cum rezultă din afirmația categorică: „anticorpii antiidiotipici sînt forța reglatoare-cheie a sistemului imunitar".

Ulterior, numeroase fapte de observație au furnizat date în favoarea acestui punct de vedere. Astfel, s-a demonstrat experimental că, în cursul unei cascade de imunizare (antigen → Ac1 → Ac2 → Ac3 → Ac4 etc.), idiotipurile pot funcționa ca ținte pentru semnalele de reglare. Procesul de reglare se realizează la animalele normale prin producerea echilibrată de idiotopi și antiidiotopi.

După imunizare are loc o creștere masivă a anticorpilor specifici în sînge și, ca urmare, o creștere a idiotipurilor lor caracteristice. La rîndul lor, aceste molecule idiotipice stimulează un răspuns antiidiotipic, care limitează primul răspuns imun și readuce sistemul imunitar la starea de echilibru (Urbain și colab., 1977; Cazenave, 1977). Astfel, spre exemplu, limfocitele B, capabile să recunoască un anumit antigen străin, poartă pe suprafața lor Ig-receptor, în a căror structură există, pe lîngă situsul de legare (paratop) capabil să recunoască antigenul, și anumiți idiotopi. Aceste Ig-receptor sînt identice cu anticorpii (Ac1) pe care celula respectivă îi produce dacă este stimulată de antigen. În absența antigenului însă, limfocitele B care poartă pe suprafața Ig-receptor de tip Ac2 (antiidiotip) controlează proliferarea celulelor ce poartă Ac1, pentru că Ac2 recunosc Ac1 prin interacțiune cu idiotipurile acestora. Ca urmare, nu se secretă anticorpi. După injectarea antigenului străin, limfocitele B capabile să producă Ac1 sînt stimulate, încep să prolifereze, să sintetizeze și să elibereze Ac1. Celulele B tip Ac2 antiidiotip sînt depășite și ulterior răspund prin propria lor proliferare, secretînd anticorpi antiidiotip. Din această

relație rezultă că predominarea Ac2 suprimă răspunsul în Ac1, iar deficitul de Ac2 permite exprimarea Ac1. Interacțiunile amorsate de antigen nu se sfîrșesc cu formarea de Ac2, ci se propagă în rețea, amorsînd întreaga gamă de interacțiuni complexe care modulează răspunsul imun.

Descrierea a două tipuri de celule T_H (ca și a două tipuri de celule T_S) sugerează existența fenomenelor de reglare și la nivel celular, așa cum, de altfel, era de așteptat. Cele două tipuri de celule au fost numite T_H1 și T_H2, deoarece acționează adesea secvențial.

Celulele T_H1 sînt specifice pentru antigen („Antigen-specific T_H cell") și recunosc determinanții antigenici de pe molecula „purtător" („Carrier") din structura antigenelor T dependente. Ele pot ajuta celulele B, care recunosc alți epitopi ai antigenului, printr-un mecanism supus restricției CMH (T_{H-CMH}).

Celulele T_H2 specifice pentru idiotip („Idiotype-specific cell") stimulează selectiv proliferarea populației de celule B care poartă idiotipul dominant. Deoarece celulele T sînt heterogene funcțional (T_H, T_S, T_C, T_{CS}), este evident că unele interacțiuni din rețeaua idiotipică pot stimula răspunsul imun, în timp ce altele îl pot supresa. Prin acest mecanism complex, încă neelucidat, rețeaua idiotipică își exercită funcția imunoreglatoare esențială.

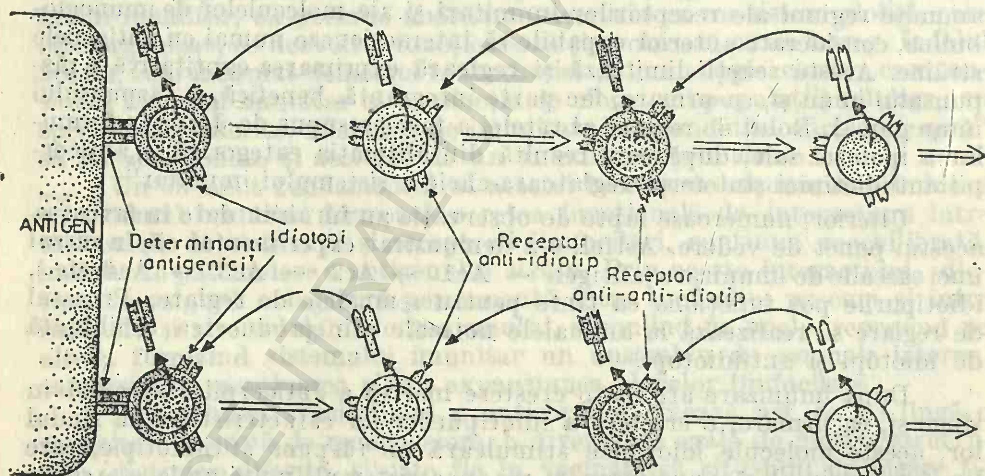


Fig. 307. — Rolul rețelei idiotipice în reglarea răspunsului imun. Perturbarea produsă de antigen se propagă sub formă de interacțiuni în rețea. Interacțiunile pot avea loc și în sens invers, deoarece fiecare populație de celule secretă anticorpi antiidiotip, care se leagă de idiotipurile populațiilor de anticorpi și ai celulelor precedente. Efectul poate fi de inhibare sau de stimulare a răspunsului imun (după Kenney, Melnick și Dreesman, 1986).

La modul general, este evident că interacțiunile în rețea nu sînt unidirecționale, ci pot avea loc și în sens invers (fig. 307): fiecare populație de celule secretă anticorpi anti-Id, care se leagă de idiotipurile situate pe populația precedentă de celule sau de anticorpi. În funcție de natura lor aceste reacții pot stimula sau supresa răspunsul imun.

Interacțiunile reglatoare se realizează, în special, prin cîțiva idiotopi cu rol fiziologic de reglare („Regulatory idiotopes"), care apar la diferite nivele ale rețelei idiotipice.

Rolul reţelei idiotipice în asigurarea memoriei imunologice

După Jerne (1974), existenţa unei reţele idiotipice persistente, de modulare a răspunsului imun, poate explica mai degrabă memoria imunologică, în lumina teoriei „păcatului originar" („Original sin theory"), (Fazekas de StGroth), decît persistenţa unei populaţii de celule limfocitare cu memorie.

Truffa-Bachi (1983) se raliează acestui punct de vedere, dar consideră memoria imunologică într-un cadru mai complex, avînd la bază mai multe mecanisme, ce pot acţiona autonom sau sinergic, ca, de exemplu:

1) Persistenţa îndelungată în organism a unor doze extrem de mici de antigen. Ele ar stimula continuu interacţiunile idiotipice, menţinînd limfocitele într-o stare de „preactivare", care le-ar permite să răspundă mai intens la un contact repetat cu acelaşi imunogen.

2) Interacţiunile idiotipice dintre diferiţii constituenţi ai sistemului imunitar, iniţiate cu ocazia primei expuneri la un antigen, ar fi suficiente pentru întreţinerea informaţiei astfel dobîndite.

3) Persistenţa celulelor cu viaţă lungă, cu memorie.

Rolul interacţiunilor idiotip/antiidiotip în producerea bolilor autoimune

Unele boli autoimune sînt consecinţa proliferării unor clone limfocitare şi/sau sintezei unor anticorpi care recunosc compuşii self.

Astfel, miastenia gravis (oboseală, epuizare musculară, evoluînd cu paralizie musculară progresivă) este determinată de atacul imunologic al receptorului de acetilcolină, prin care muşchii primesc semnale chimice de la nervi. Acest mecanism a fost demonstrat experimental prin inducţia bolii la iepure. În acest scop au fost iniţial induşi anticorpi faţă de o substanţă care leagă receptorul. Anticorpii astfel produşi (Ac1) au fost utilizaţi ca imunogen, pentru a produce la alţi iepuri anticorpi antiidiotipici. Aceştia poartă imaginea unei părţi esenţiale a substanţei de legare, deoarece inoculaţi la animale normale se leagă de receptorul de acetilcolină şi determină miastenia gravis. Boala a fost indusă şi la şoarece, prin injectarea limfocitelor capabile să secrete anticorpi anti-Id monoclonali.

Boala Graves-Basedow cu ansamblul simptomatologiei sale (hipertiroidism, guşă, exoftalmie, tahicardie etc.) poate fi, de asemenea, indusă experimental prin administrarea de anticorpi antiidiotipici. În acest caz se utilizează anticorpi anti-Id produşi faţă de anticorpii antitirotropină (hormonul care stimulează creşterea tiroidei), în aşa fel încît idiotipul mimează structura hormonului, se leagă de receptorii celulari şi stimulează activitatea tiroidei.

Interacţiunile idiotip — antiidiotip sînt implicate şi în patogenia altor boli autoimune, caracterizate prin prezenţa unor anticorpi neobişnuiţi care au ca ţintă determinanţi proprii organismului-gazdă. Între acestea sînt de amintit: 1) artrita reumatismală asociată cu prezenţa factorilor reumatoizi (produşi faţă de un segment din moleculele de Ig, după Bona (1986) Ac2ε) şi 2) lupusul sistemic eritematos caracterizat prin prezenţa anticorpilor anti-ADN.

Aplicații practice ale teoriei rețelei idiotipice

Interacțiunile complexe idiotip/antiidiotip pot sta la baza unor aplicații importante pentru prevenirea sau terapeutica unor boli, pentru cercetare și diagnostic. În același timp, înțelegerea lor permite descifrarea rolului lor în geneza unor boli de tipul celor autoimune.

Vaccinurile antiidiotipice. Una dintre consecințele majore ale conceptului de imagine internă este posibilitatea utilizării Ac2β ca surogat de antigen, respectiv ca imunogen. Procedeul este recomandabil în cazurile în care antigenul este greu de obținut sau nu poate fi utilizat din diferite motive. Ca atare, singura condiție este ca anticorpii antiidiotipici Ac2β să mimeze efectiv configurația epitopului unui antigen. Pentru aceasta, nu este necesar ca el să fie în mod obligatoriu structural identic cu epitopul, în sensul existenței unor secvențe exacte a aminoacizilor în regiunile hv și în epitop. După cum s-a demonstrat, este suficient ca asemănarea să fie de așa natură încît să permită formarea unui set de legături secundare cu idiotopul, similare celor formate cu epitopul. Faptul este explicabil, deoarece răspunsul imun dorit este reprezentat de producerea de idiotipuri (Ac1). O confirmare a acestei necesități decurge și din faptul că anticorpii antiidiotipici pot acționa ca imagini interne ale antigenelor glucidice, cu care orice identitate de structură moleculară este exclusă.

Aplicațiile în terapeutica oncologică sînt multiple.

După Scott-Rodkey (1980), în cazul tumorilor generate de limfocitele T sau B, în care toate celulele exprimă teoretic receptori cu același idiotip de suprafață, un antiidiotip corespunzător poate elimina celulele tumorale, lăsînd țesutul normal nelezat.

După Kennedy, Melnick și Dreesman (1985), în cursul unui tratament experimental, aproximativ jumătate din bolnavi au răspuns favorabil din punct de vedere clinic. În cursul tratamentului au apărut celule tumorale care exprimă un idiotip diferit, ceea ce sugerează necesitatea administrării unor anticorpi antiidiotipici cu specificități multiple.

Vitetta și Uhr au demonstrat capacitatea anticorpilor antiidiotipici cuplați cu toxice celulare (ricin) de a distruge celulele B leucemice de șoarece, în culturi de celule. Anticorpii antiidiotipici se leagă de moleculele de Ig-receptor de pe celulele B, depunînd moleculele de toxină la nivelul celulelor-țintă, asigurînd distrugerea lor specifică. *In vivo*, la șoarece, efectul este doar de încetinire a creșterii.

Rezultate bune au fost obținute și în terapeutica neoplasmului de colon, în care anticorpii antiidiotipici specifici pentru antigenele tumorale au produs ameliorări clinice și resorbția masei tumorale. Se apreciază că gama acestor aplicații terapeutice este restrînsă, din cauza cunoștințelor limitate referitoare la natura antigenelor tumorale.

Scott-Rodkey (1980) citează un alt exemplu de utilizare a anticorpilor, legată de fenomenul de modulare a antigenelor. El constă în pierderea temporară a antigenelor tumorale, consecutivă unor interacțiuni antigen — anticorp la suprafața celulei, urmată de „bonetarea" și endocitoza complexelor prin pinocitoză. În urma acestui proces, celulele tumorale sînt lipsite de antigenele caracteristice și, în consecință, nu mai sînt

recunoscute de limfocitele T_C ca ţintă pentru fenomenele de citoliză. Producerea de anticorpi auto-antiidiotipici poate elimina anticorpii specifici pentru antigenele tumorale, lăsîndu-le intacte, pentru a deveni ţintă accesibilă celulelor citolitice.

Imunologia transplantelor de ţesuturi şi organe reprezintă un alt domeniu potenţial de aplicaţii, prin capacitatea anticorpilor auto-antiidiotipici de a interfera cu răspunsul anticorpilor sau al celulelor T faţă de antigenele de histocompatibilitate.

Utilizarea anticorpilor antiidiotipici în cercetarea ştiinţifică

Anticorpii antiidiotipici permit reperarea exactă a situsurilor de legare a virusurilor pe suprafaţa celulelor sistemului imunitar. În acest scop, anticorpii Ac1, produşi la animale injectate cu proteină capsidală sau cu spicule din învelişul extern, sînt utilizaţi pentru a produce anticorpi antiidiotipici (Ac2). În cazul în care aceştia poartă imaginea internă a antigenului viral, ei simulează funcţia acestuia şi se leagă de receptorii celulari de virus. Localizarea lor poate fi reperată cu ajutorul microscopiei fotonice, dacă anticorpii anti-Id sînt marcaţi cu coloranţi fluorescenţi, sau prin microscopie electronică, în cazul marcării cu feritină.

Tehnica este utilizabilă, în special, în cazul virusurilor greu de izolat şi de purificat, care nu pot fi folosite direct pentru identificarea receptorilor celulari. Printre rezultatele notabile obţinute cu această tehnică este de menţionat detectarea receptorilor pentru reovirusuri, pe suprafaţa celulelor nervoase şi a celor aparţinînd sistemului imunitar (Greene şi Fields, 1983).

[illegible]

(AcI). O confirmare [illegible]

[illegible]

[illegible] ciele T sau B, în care toate celulele exprimă aceiași receptori cu [illegible] idiotip de suprafață, un anticorp [illegible] corespunzător poate elimina celulele tumorale, lăsînd [illegible] normal [illegible].

După Kennedy, Melnick și Dreesman (1985), în cursul unui tratament experimental, aproximativ jumătate din bolnavi au răspuns favorabil din punct de vedere clinic. În cursul tratamentului au apărut celule tumorale care exprimă un idiotip diferit, ceea ce sugerează necesitatea administrării unor anticorpi antiidiotipici cu specificități multiple.

Vitetta și Uhr au demonstrat capacitatea anticorpilor antiidiotipici cuplați cu toxine celulare (ricin) de a distruge celulele B leucemice de șoarece, în culturi de celule. Anticorpii antiidiotipici se leagă de moleculele de Ig [illegible] ale celulelor B, depunînd moleculele de toxină la nivelul celulelor țintă, [illegible] distrugerea lor specifică. In vivo, la șoarece, efectul este doar de [illegible].

Rezultate bune au fost obținute și în terapeutica [illegible] de colon, în care anticorpii antiidiotipici specifici pentru antigenele tumorale au produs [illegible] și resorbția masei tumorale. Se apreciază că gama acestor aplicații terapeutice este restrînsă, din cauza cunoștințelor limitate [illegible] privitoare la natura antigenelor tumorale.

[illegible] (1983) [illegible] un alt exemplu de utilizare a anticorpilor, legată de fenomenul de modulare a antigenelor. El constă în pierderea temporară a antigenelor tumorale, consecutivă unei interacțiuni antigen – anticorp la suprafața celulei, urmată de „bonetarea" și endocitoza complexelor prin pinocitoză. În urma acestui proces, celulele tumorale sînt lipsite de antigenele caracteristice și, în consecință, nu mai sînt

VACCINURILE VIITORULUI

„Vaccinurile nu reprezintă decît una din abordările problemelor de sănătate umană. Succesul lor va depinde de efortul universal făcut pentru ca ele să se integreze realmente în dezvoltarea armonioasă și chibzuită a omului în cadrul său de viață"

P. H. LAGRANGE

„Ameliorarea vaccinurilor tradiționale și punerea la punct a unor vaccinuri cu o concepție complet nouă oferă, în sfîrșit, speranța unei lupte eficiente împotriva principalelor boli infecțioase"

A. SASSON

Vaccinurile viitorului

„Încă de pe timpul lui Jenner și Pasteur, vaccinarea a fost acceptată ca o parte a modului nostru de viață și constituie una din realizările cele mai reușite ale imunologiei"

R. Arnon, M. Sela

Utilizarea vaccinurilor în profilaxia bolilor transmisibile, inițiată acum aproape două secole (Jenner, 1796), prin vaccinarea antivariolică, a reprezentat o contribuție enormă la îmbunătățirea stării de sănătate a omului și animalelor, cel puțin în țările în care au fost aplicate cu o anumită rigurozitate.

Diversificarea vaccinurilor și extinderea aplicării lor au devenit posibile odată cu descoperirea de către Pasteur (1880, 1885) a principiului atenuării virulenței agenților patogeni (virusuri și microorganisme), care a marcat producerea primului vaccin, bazat pe principii imunologice, și cu o serie de mari progrese tehnice (cultivarea pe oul embrionat, culturile celulare *in vitro*, perfecționarea tehnicilor de cultivare a bacteriilor etc.). Cu toate imperfecțiunile sale, vaccinarea rămîne, în multe cazuri, cea mai bună metodă profilactică față de bolile transmisibile. Ea a permis eradicarea variolei pe plan mondial (1980) și controlul celor mai multe boli, anterior răspîndite și grave ca febra galbenă, poliomielita și rujeola la om, febra aftoasă, bolile Newcastle și Marek la animalele domestice.

Cu toate că au fost produse vaccinuri noi, eficiente, și au fost ameliorate practicile mai vechi, tot mai mulți specialiști recunosc faptul că „deși vaccinurile sînt considerate cel mai puternic tratament imunologic produs vreodată, în acest domeniu au fost obținute numai puține progrese de la primele descoperiri" (Chedid, 1985). Explicația decurge, după Morein și colab. (1987), din faptul că, în general, cercetarea consacrată vaccinurilor a fost tradițională, limitată la anatoxine și la vaccinurile inactivate sau atenuate, și a vizat asigurarea protecției în special față de agenți patogeni care produc infecții acute. Fără a contesta importanța vaccinării, ca unul din succesele mari ale imunologiei moderne, a devenit evident că unele vaccinuri sînt puțin eficiente și că unele boli grave și/sau larg răspîndite rămîn în afara cadrului de protecție asigurat de vaccinurile convenționale.

Unele argumente majore impun cu necesitate un demers critic, de reevaluare a problemei vaccinurilor, în perspectiva unor abordări radical modificate în viitor:

1) Tehnicile convenționale nu permit obținerea unor vaccinuri eficiente și accesibile în cazul unor boli grave produse de agenți patogeni încă necultivabili sau greu cultivabili *in vitro*, cu mare variabilitate antigenică, precum și în unele boli parazitare ca malaria, tripanosomiazele,

schistosomiaza ş.a. Deşi hepatita B afectează milioane de oameni şi reprezintă o problemă majoră de sănătate publică, atît prin forma acută a bolii, cît şi prin sechelele ei, nu beneficiază de o profilaxie specifică. Singurul vaccin disponibil, în cantităţi foarte mici şi la un preţ ridicat, produs prin concentrarea antigenului prezent în sîngele purtătorilor este limitat ca aplicare la grupurile în mod particular expuse riscului de contaminare (cercetători din laboratoare, personal medical). În mod asemănător, virusul hepatitei A, greu cultivabil *in vitro*, nu este disponibil în cantităţile necesare pentru producerea unui vaccin. În unele cazuri, ca, de exemplu, cel al vaccinurilor antiparazitare, datorită complexităţii de organizare a microorganismelor, ciclurilor de viaţă variate şi cunoaşterii insuficiente a mecanismelor protectoare, nu este încă definit riguros nici cadrul conceptual de abordare.

2) Apariţia prin evoluţie de noi tulpini virale cu mare variabilitate antigenică, cu specificităţi serologice diferite de cele ale tulpinilor utilizate curent în producţia vaccinurilor şi riscul consecutiv al unei protecţii insuficiente, implică necesitatea adaptării permanente la exigenţele situaţiei epidemiologice.

3) Riscurile legate de dificultatea de a controla gradul de atenuare a unor virusuri, de a asigura stabilitatea lor şi teama de reversia virulenţei.

4) Marile descoperiri şi restructurări tehnice şi conceptuale ale imunologiei moderne şi ale biologiei moleculare sugerează noi perspective, mai mult sau mai puţin îndepărtate, de abordare. Între acestea sînt de menţionat :

a) determinarea structurii determinanţilor antigenici şi a bazelor fizicochimice ale imunogenităţii ;

b) stabilirea faptului că, dintre numeroşii determinanţi antigenici (epitopi), prezenţi în structura unui virus, numai un număr limitat produc anticorpi neutralizanţi şi sînt implicaţi efectiv în producerea unui răspuns imun protector ;

c) descifrarea] interacţiunilor celulare în cursul răspunsului imun ;

d) stabilirea mecanismelor de modulare a răspunsului imun şi identificarea unei serii de substanţe ce îl pot amplifica ;

e) posibilitatea determinării secvenţei aminoacizilor în structura polipeptidelor imunogene şi a nucleotidelor în genele care le codifică ;

f) obţinerea antigenelor sintetice ;

g) izolarea sau sinteza genelor şi posibilitatea clonării lor în structura unor virusuri, bacterii sau levuri, cu ajutorul tehnologiei ADN recombinant ;

h) formularea teoriei reţelei idiotipice a răspunsului imun, cu consecinţele ei practice, privind utilizarea potenţială a anticorpilor antiidiotipici în inducţia răspunsului imun etc.

Aceşti factori, a cărui enumerare este departe de a fi exhaustivă, impun o abordare critică a vaccinurilor convenţionale, a parametrilor caracteristici celor cu eficienţă superioară şi a perspectivelor de dezvoltare a acestui domeniu (Rowlands, 1986 ; Liew, 1985).

Vaccinurile convenţionale

Vaccinurile inactivate

Sînt folosite pe scară largă, în unele cazuri cu rezultate foarte bune (fig. 308). Ele au avantajul aprioric al inocuităţii, decurgînd din obligaţia producătorului de a controla inactivarea totală a agentului patogen.

Procedeele clasice de inactivare (fenol, formaldehidă, mertiolat), deşi foarte utile în practică, au fost utilizate fără o bază ştiinţifică riguroasă, cu atît mai mult cu cît acţiunea lor implică distrugerea selectivă a infecţiozităţii, cu menţinerea nemodificată a proprietăţilor imunogene. Aceasta explică rarele accidente determinate de formaldehidă, decurgînd din cinetica nelineară de inactivare şi din incapacitatea sa de a neutraliza infecţiozitatea unor virusuri (SV40). În prezent se folosesc inactivatori mai fiabili, care acţionează direct asupra materialului genetic, ca beta-propiolactona, hidroxilamina sau unele imine (BEI — „Binary-ethylen imine" sau AEI — „Acetyl-ethylen imine").

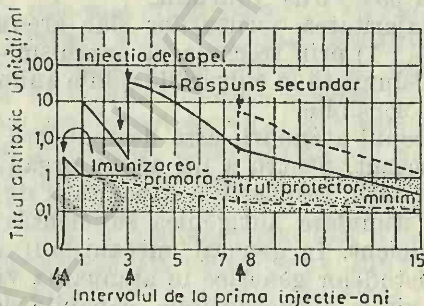


Fig. 308. — Dinamica producerii antitoxinelor în cursul răspunsului imun primar şi după injecţia de redeşteptare a imunităţii. Relaţia lor cu nivelul minim protector.

Între dezavantajele vaccinurilor inactivate, cele mai frecvent menţionate sînt următoarele:

1) Capacitatea imunogenă redusă, limitată la producerea unui răspuns mai intens în anticorpi, cu un efect slab asupra imunităţii mediate celular, exceptînd cazul utilizării substanţelor adjuvante.

2) Prezenţa unei cantităţi mari de substanţe neesenţiale, imunologic inactive, care depăşesc mult ponderea constituenţilor ce asigură o protecţie eficientă. Efectul lor negativ se poate manifesta fie prin apariţia unor fenomene colaterale (durere, reacţii locale, hipersensibilitate faţă de proteine străine, antibiotice, prezervanţi etc.), fie prin contracararea efectului determinanţilor imunogeni şi inhibarea sau blocarea răspunsului imun protector.

3) Aplicarea parenterală, cu injecţii repetate la anumite intervale bine determinate, îngreuiază imunizarea completă, mai ales în cazul vaccinurilor reactogene, necesită cantităţi mari de vaccin şi personal calificat. Starea de rezistenţă conferită este de scurtă durată şi trebuie stimulată prin injecţii de redeşteptare a imunităţii (rapel).

4) Producția unor cantități mari de virusuri sau de microorganisme, în special în cazul unor agenți foarte patogeni, pune uneori probleme greu de rezolvat. Astfel, după Rowlands (1986), producția celor două miliarde de doze de vaccin contra febrei aftoase necesită 10 milioane de litri de suspensie virală, foarte contagioasă.

5) Vaccinurile inactivate nu stimulează procesele de imunitate locală la nivelul mucoaselor și sinteza sIgA. Ca urmare, organismele vaccinate protejate de boală permit colonizarea mucoaselor, replicarea locală a virusurilor și transmiterea lor.

Vaccinurile atenuate

Sînt din multe puncte de vedere evident superioare celor inactivate. Foarte rar s-a recurs la virusuri atenuate natural, cum este virusul de vaccină („Cowpox virus"), cu virulența mult redusă, dar capabil să se replice și să inducă o imunitate de lungă durată față de virusul variolic („Small pox virus") înrudit.

Majoritatea virusurilor sînt atenuate în laborator, în special pe două căi : 1) prin trecerea pe organisme-gazdă nenaturale și 2) prin cultivare îndelungată în culturi de celule animale pînă cînd nu mai îmbolnăvesc speciile sensibile.

Scopul atenuării este de reducere stabilă a virulenței, la un nivel foarte scăzut, pentru a nu dăuna organismelor vaccinate, cu menținerea infecțiozității, respectiv a capacității de replicare, necesară pentru a furniza o stimulare antigenică suficientă pentru producerea unui răspuns imun eficient. În general, mecanismul atenuării nu este cunoscut. Aplicarea metodelor genetice în atenuarea virulenței a permis obținerea unor tulpini virale termosensibile, capabile de replicare numai în regiuni mai reci ale corpului la 32 — 33°C (la nivelul căilor respiratorii superioare), dar inactive la 37°C. Ele nu au fost însă folosite în practică (Rowlands, 1986). În general, atenuarea celor mai multe virusuri (febră galbenă, rujeolă, rubeolă, oreion) trebuie să atingă gradul necesar pentru a împiedica transmiterea în jurul persoanelor vaccinate. Transmiterea este acceptată în cazul poliovirusului atenuat din vaccin și considerată chiar ca avînd un efect benefic la nivel populațional.

Avantajele vaccinurilor atenuate. Numeroase observații epidemiologice, clinice și experimentale atestă superioritatea vaccinurilor atenuate în comparație cu cele inactivate.

Aceasta se manifestă, în primul rînd, prin gradul înalt de protecție conferit și prin durata sa îndelungată. Vaccinarea cu virusuri atenuate echivalează cu o infecție ușoară sau asimptomatică, în cursul căreia replicarea asigură eliberarea în organism a unei cantități mari de determinanți antigenici cu o structură identică celei existente în compoziția agentului patogen. Efectul nu este determinat exclusiv de doza mai mare de determinanți antigenici, ci, probabil, chiar în mai mare măsură, de unii factori care țin de mecanismele moleculare intime ale răspunsului imun. Virusul replicat intracelular furnizează determinanți antigenici a căror asociere

cu moleculele CMH de pe suprafața celulelor care prezintă antigenul este foarte promptă și eficientă, asigurînd stimularea celulelor sistemului imunitar. Ea are un efect incomparabil superior celui de asociere pasivă a determinanților din vaccinurile nereplicative.

În cazul gripei, imunitatea mai solidă, conferită de vaccinul atenuat, comparativ cu cel inactivat, se explică prin incapacitatea virusului inactiv de a activa precursorii celulelor T_C, care în stadiul de celule efectoare mature au un rol important în protecția față de această infecție (Yap, Ada și McKenzie, 1978).

Vaccinurile atenuate angrenează participarea tuturor țesuturilor importante din punct de vedere imunologic, stimulînd întregul repertoriu de reacții imunitare, mediate umoral și celular. Ca urmare, răspunsul imun include și participarea mecanismelor de protecție a mucoaselor, producerea de sIgA și limitează răspîndirea infecției în populație. În cazul poliomielitei, administrarea orală a virusului atenuat creează o stare de imunitate locală, care blochează accesul virusului sălbatic la celulele sensibile.

Vaccinurile atenuate sînt ușor de administrat și nu necesită participarea unui personal specializat. În cele mai multe cazuri, o singură doză este suficientă pentru a asigura apariția unei imunități satisfăcătoare. Face excepție vaccinarea antipoliomielitică orală (Sabin), în care sînt necesare trei imunizări, la intervale de o lună. Această schemă de vaccinare este motivată de tendința celor trei tipuri de virus din vaccin de a competiționa în cursul replicării lor în intestin. Interferența are ca rezultat predominarea unui tip în cursul primei imunizări și a altor tipuri în imunizările ulterioare. De altfel, interferența virală este un fenomen de care trebuie ținut seama atît atunci cînd se administrează într-o perioadă scurtă de timp mai multe vaccinuri atenuate replicative, cît și sub raportul riscului posibil de interferență a virusului din vaccin cu un virus natural circulant. În general, intervalul dintre două imunizări succesive trebuie să fie de minimum patru săptămîni, deși în unele cazuri (rujeolă, rubeolă, oreion), răspunsul după administrarea simultană poate fi egal cu cel consecutiv aplicării individuale.

Dezavantajele vaccinurilor atenuate. Dezavantajul major decurge din temerea de revenire a virulenței inițiale a virusului, după replicare îndelungată în organismele vaccinate. Unele date referitoare la Poliovirus pledează în acest sens. Analiza genetică a permis stabilirea secvenței exacte a nucleotidelor în genomul virusului sălbatic și a tulpinilor virale atenuate din vaccinul oral Sabin. După datele lui Nomato și colab. (1984), virusul polio de tip 1, din vaccinul Sabin, diferă de virusul sălbatic neurovirulent, prin 56 de substituiri nucleotidice în genom, cărora le corespunde substituirea a 21 de aminoacizi. În mod similar, virusul atenuat de tip 3 diferă de progenitorul său neurovirulent numai prin 10 substituiri nucleotidice, cărora le corespund trei substituiri de aminoacizi (Stanway și colab., 1984). Aceasta demonstrează că virusul de tip 3 este cel mai potrivit pentru a suferi eventual reversia la neurovirulență. Un mecanism de acest gen ar putea explica, spre exemplu, cele 102 cazuri de poliomielită asociate cu vaccinarea, înregistrate în S.U.A., în perioada 1969–1980

(25 de cazuri la vaccinați, 65 la contacți sănătoși, 12 la persoane cu imunodeficiențe).

Unele progrese realizate în determinarea modificărilor moleculare corelate cu neurovirulența ar putea deschide calea obținerii unor tulpini virale atenuate mult mai stabile. Astfel, Cann și colab. (1984) au arătat că substituirea unui singur nucleotid în regiunea 5', necodificatoare a genomului, este totdeauna corelată cu gradul de neurovirulență a virusului. Reversia la nucleotidul de tip sălbatic în această poziție s-ar putea produce în intestinul uman, însă gradul de neurovirulență conferit virusului din vaccin, de această mică modificare, este inferior celui al virusului sălbatic. Pînă cînd se vor realiza modificări mai puțin mutabile ale acestei regiuni a genomului viral, rata ridicată a mutațiilor semnalată în cazul virusurilor cu genom ARN (1 la 10^4) face ca reversia potențială a unor caractere de virulență să rămînă o problemă preocupantă.

Vaccinurile atenuate prezintă riscul de a conține alte virusuri contaminante, preluate din sistemul utilizat pentru cultivare. Problema a existat și în cazul vaccinului inactivat antipolio, produs pe celule de maimuță, cu virusul SV40, care în prezent poate fi exclus, dar există riscul existenței altor virusuri nedecelate.

În timp ce unele virusuri atenuate (Cowpox) pot fi menținute stabile în special liofilizate, după Rowlands (1986), majoritatea virusurilor atenuate sînt mai puțin stabile, mai fragile, comparativ cu echivalenții lor sălbatici. Între altele, vaccinurile antipolio și antirujeolic pun probleme legate de conservare și de stabilitate.

Între dezavantajele vaccinurilor atenuate, numeroși autori semnalează și numărul mare de contraindicații. Cu excepția marilor epidemii, vaccinurile atenuate nu se administrează la gravide, de teama de a nu afecta fătul, care nu are încă un sistem imunitar eficient, deși pînă în prezent nu au fost semnalate accidente de acest gen. De asemenea, nu se administrează persoanelor cu deficit imunitar, tratate cu substanțe imunosupresoare, iradiate, suspecte de leucemie, limfoame etc.

Aceste limite ale vaccinurilor convenționale au determinat în ultimii ani pe plan mondial o acțiune de reconsiderare a problemei în vederea stabilirii strategiilor de dezvoltare în viitor. Într-un studiu prospectiv, Vane și Cuatrecasas (1984) propun cinci faze în evoluția concepțiilor asupra vaccinurilor și a factorilor determinanți ai acestei evoluții:

A) Vaccinurile convenționale (inactivate și atenuate, bazate, în principal, pe cunoștințe empirice).

B) Vaccinurile îmbunătățite (culturi pe scară mare, inclusiv de celule animale, purificarea antigenelor, cunoașterea situsurilor imunogene, bazele genetice ale virulenței etc.).

C) Proteine izolate, izolarea și clonarea genelor, determinarea structurii antigenelor, anticorpi monoclonali, adjuvanți noi.

D) Peptide sintetice (sinteza chimică a antigenelor, studiul configurației lor, înțelegerea mecanismului de acțiune a adjuvanților).

E) Peptide sintetice, administrate exclusiv pe cale orală.

Studiul nu include perspectiva vaccinurilor obținute prin tehnici de inginerie genetică și nici a celor bazate pe anticorpi antiidiotipici. Există un acord general în a considera că vaccinurile viitorului trebuie să ia în considerare particularitățile fiecărei boli infecțioase ca un caz aparte și să stabilească strategia vaccinării în acord cu acestea.

Un vaccin ideal trebuie să însumeze o serie de calități, între care sînt de menționat:

1) să inducă o stare solidă și prelungită de protecție, cu riscuri nule sau minime, legate de efecte secundare nedorite și de complicații;

2) pe lîngă protecția față de boală, să împiedice colonizarea și multiplicarea periferică a agentului patogen și să restrîngă astfel, pericolul răspîndirii infecției la contacții neimunizați;

3) să fie disponibil în cantități suficiente și la un preț accesibil, deoarece numai programele de vaccinare care asigură un grad satisfăcător de imunitate în populație permit controlul pe termen lung al răspîndirii bolilor transmisibile și eventual eradicarea lor.

Între exigențele de natură imunologică, Liew (1985) citează următoarele:

1) Eficiența unui răspuns protector umoral a fost demonstrată în diferite sisteme (virusuri, bacterii, paraziți) prin acțiuni potențiale complexe ca: neutralizarea directă, liza celulelor-țintă dependentă de complement, opsonizare și imunofagocitoză, citotoxicitate celulară dependentă de anticorpi, hipersensibilitate imediată etc.

2) În cazul infecțiilor ce evoluează cu viremie și recircularea agentului patogen, imunitatea umorală este importantă atît pentru blocarea infecției la poarta de intrare în organism, cît și pentru eliminarea ulterioară a agentului patogen și vindecare.

3) În cazul agenților patogeni obligat intracelulari, activarea macrofagelor de către limfokinele secretate de celulele T specifice poate reprezenta mecanismul major de protecție.

4) Dată fiind natura nespecifică a activării macrofagelor, stimularea lor trebuie optimizată cu grijă, iar în cazul infecțiilor care afectează organele vitale chiar evitată, pentru a împiedica apariția unor efecte nocive pentru gazdă.

5) Reactivitatea celulelor T_C, deși nu joacă un rol dominant în prevenirea infecțiilor, este importantă pentru vindecare, în special în cazul infecțiilor cu agenți patogeni obligat intracelulari, cu stadii de replicare neinfecțioasă.

6) Imunitatea locală, ca, de exemplu, cea conferită de sIgA, este extrem de utilă față de infecțiile mucoaselor deoarece creează un mediu local ostil colonizării și multiplicării agenților patogeni.

Vaccinurile ribosomale

Primul vaccin ribosomal a fost obținut de Youmans și Youmans (1965), care au demonstrat că extractele ribosomale din *Mycobacterium tuberculosis* avirulent imunizează șoarecele față de inocularea de probă cu bacterii virulente. Separarea preparatelor ribosomale în cinci fracțiuni, în gradient de sucroză, pe baza cantității de ARN prezent, a arătat că fracțiunea cu imunogenitate maximă corespunde celei care conține ARN dublu catenar sau înalt organizat. Pe această bază, Youmans și Youmans (1974) au sugerat ca mecanism potențial de acțiune, posibilitatea ARN din vaccin de a acționa ca matriță pentru transcrierea inversă la ADN, care ulterior ar fi transcris la ARN ribosomal. Ei au mai demonstrat că subunitățile 30S și 50S disociate sînt mult mai imunogene decît ribosomii 70S intacți și că ARN din *M. tuberculosis* acționează ca un adjuvant puternic : el stimulează producerea de anticorpi la animalele de laborator imunizate cu gamaglobulină bovină sau cu diferite tipuri de poliribonucleotide.

Ulterior, s-a demonstrat experimental capacitatea protectoare a vaccinurilor ribosomale față de un număr mare de bacterii, microfungi și protozoare, ca, de exemplu : *Streptococcus pyogenes*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Francisella tularensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Brucella abortus*, *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania enriettii* ș.a. Ribosomii extrași din *Yersinia pestis* sînt lipsiți de capacitate protectoare (Johnson, 1972).

Tehnica de preparare utilizată de Gregory și Schechmeister (1982) pentru *Streptococcus mutans* include folosirea bacteriilor în faza de creștere activă, în cursul căreia numărul ribosomilor este maxim, urmată de distrugerea lor într-un omogenizator cu microperle de sticlă. După suspendare într-o soluție tampon fosfat 10^{-2}M, la pH 7,4, care conține 10^{-2} $MgCl_2$ și 3 μg DNază/ml, celulele distruse și resturile celulare sînt îndepărtate prin două centrifugări, cîte 10 minute, la 27 000 g și respectiv 47 000 g. Ribosomii obținuți sînt spălați inițial de 5 ori în soluția tampon, prin centrifugare la 250 000 g (cîte 2,5 ore) și final, de două ori, la 47 000 g (cîte 20 minute). După filtrare prin filtre de membrană sterile, extractul conține particule ribosomale cu coeficientul de sedimentare 70S. Prin incubare în soluție tampon magneziu 10^{-4}M, acestea se disociază la subunitățile 54S și 32S, care sînt mai imunogene. Vaccinul astfel obținut induce un răspuns imun puternic umoral și mediat celular, la iepure și la șobolan. Anticorpii din ser și din saliva animalelor imunizate aglutinează celulele normale de *S. mutans*, inhibă aderența celulelor viabile de substraturi solide, precum și producerea de acid (fig. 309).

Faptul că serul șobolanilor imunizați cu un singur serotip de *S. mutans* reacționează intens cu celulele întregi ale celor șapte serotipuri capabile să inducă apariția cariei dentare la animale sugerează capacitatea vacci-

nului ribosomal de a proteja încrucișat. El este considerat, în consecință, ca un produs potențial foarte eficient și sigur în prevenirea cariilor dentare.

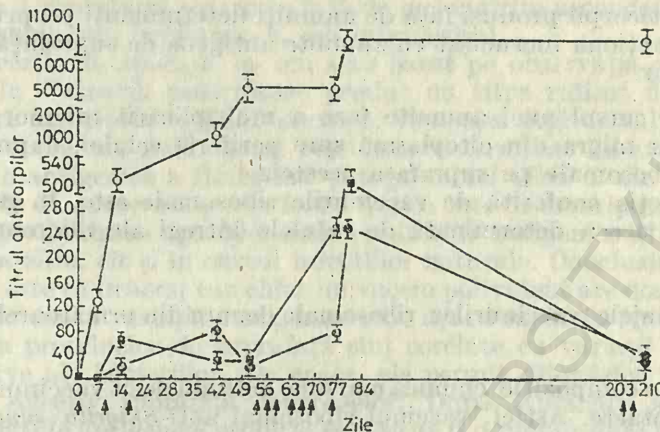


Fig. 309. — Răspunsul imun umoral la iepurii injectați cu ribosomi de *Streptococcus mutans 6715*. Săgețile indică zilele de imunizare (primele trei injecții i.m. cu adjuvant Freund, celelalte fără); ○ hemaglutinare pasivă cu hematii acoperite cu ribosomi de *S. mutans 6715*; ■ aglutinarea celulelor de *S. mutans*; ● inhibarea aderenței *S. mutans 6715* de sticlă. Fiecare punct reprezintă rezultatele obținute de la trei iepuri. Barele verticale prezintă deviația standard ±1 (după Gregory și Schechmeister, 1982).

Modul de acțiune al preparatelor ribosomale nu este cunoscut. O dificultate majoră decurge din faptul că, în prezent, nu se poate face nici o generalizare referitoare la natura fracțiunii imunogene protectoare din vaccin. Aceasta este reprezentată, după datele actuale, de ARN dublu catenar la *M. tuberculosis* și *Ps. aeruginosa*, de lipopolizaharide contaminante la *Salmonella* și *N. gonorrhoeae* și de proteinele ribosomale la *S. mutans*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* și *H. capsulatum*. În plus, toate vaccinurile ribosomale sînt contaminate cu constituenți de suprafață ai microorganismelor folosite. Astfel, vaccinul produs față de *S. mutans* conține, pe lîngă subunitățile ribosomale, șase proteine diferite, acid lipoteichoic și mai multe enzime membranare.

Au fost propuse următoarele ipoteze privind modul de acțiune, însă nici una nu este satisfăcătoare:

1) Vaccinurile ribosomale conțin molecule de ARNm, ce codifică sinteza unor constituenți ai suprafeței celulelor din care provin. La indivizii imunizați, aceste molecule ar fi traduse deci la polipeptide microbiene imunogene. Ipoteza ignoră dificultățile de utilizare a informației genetice provenite din celulele procariote în celulele animale.

2) Preparatele ribosomale sînt contaminate cu constituenți celulari, a căror capacitate imunogenă este amplificată de efectul adjuvant al substanțelor de origine ribosomală.

3) Imunogenitatea vaccinurilor ribosomale s-ar datora polipeptidelor de suprafață celulară, recent traduse la nivelul ribosomilor, care rămîn temporar legate de ARNr.

4) Anticorpii produși față de anumiți determinanți proprii ai ribosomilor ar reacționa încrucișat cu anumite antigene de suprafață ale microorganismelor.

5) În cursul unei anumite faze a multiplicării microorganismelor, ribosomii ar migra din citoplasmă spre periferia celulei, expunînd unele antigene ribosomale pe suprafața acesteia.

Protecția conferită de vaccinurile ribosomale este, în general, mai mare decît aceea determinată de celulele întregi ale microorganismelor respective.

Avantajele vaccinurilor ribosomale decurg din următoarele particularități:

1) Au o compoziție chimică mai bine definită decît vaccinurile produse cu celule intacte. Astfel, vaccinul ribosomal anti-*Shigella sonei*, care are un înalt efect protector față de keratoconjunctivita experimentală la cobai și față de disenterie la șoarece și la maimuțe, conține : 55% ARN, 35% proteine, 8% glucide și numai o cantitate mică de antigen O (Levenson și colab., 1984).

2) Conferă, cel puțin în unele cazuri, protecție încrucișată față de serotipurile unui microorganism, eliminînd necesitatea de a folosi vaccinuri multivalente.

3) Sînt mai puțin toxice decît celulele întregi la care componentele toxice sînt, de regulă, situate pe suprafața acestora.

4) Sînt mai imunogene decît vaccinurile totale, cel mai probabil datorită efectului de adjuvant al ARNr (Gregory, 1986).

Vaccinurile anti-adezive

Brinton și colab. (1982), precum și Abraham și Beachey (1985) pledează pentru ideea utilizării unor vaccinuri capabile să împiedice adeziunea bacteriilor de suprafața mucoaselor și să stimuleze fagocitoza înainte de colonizarea lor în organism.

Primul vaccin care viza acest obiectiv a fost preparat de Rutter și Jones (1973), sub forma unei suspensii de fimbrii purificate. El s-a dovedit eficient în combaterea infecțiilor cu *E. coli K 88* la purceii vaccinați sau care au primit anticorpi transplacentar prin colostru sau prin lapte de la organismul matern. Rezultate similare s-au obținut și cu fimbrii provenite de la *E. coli K 99*, în prevenirea diareilor la miei și viței, prin același efect de împiedicare a adeziunii bacteriilor de epiteliul mucoaselor. Ulterior, Silverblat și colab. (1982) au demonstrat capacitatea fimbriilor purificate de tip 1, utilizate ca vaccin, de a proteja șobolanii de pielonefrita ascendentă consecutivă infecției cu o cultură de *E. coli* virulentă. Numai 3 din 16 animalele vaccinate fac boala, în comparație cu 10 din 15 în lotul

neimunizat. Numărul bacteriilor care colonizează rinichii este mult mai mic la animalele imunizate decît la cele neimune. În sfîrşit, Abraham şi Beachey (1985) au demonstrat că anticorpii monoclonali faţă de fimbriile de tip 1 protejează şoarecele faţă de pielonefrita ascendentă produsă în mod obişnuit prin instilarea *E. coli* intravezical.

Încercările de aplicare la om s-au bazat pe observaţia că fimbriile izolate de la *Neisseria gonorrhoeae* produc un titru ridicat de anticorpi şi intensifică fagocitoza tulpinii omologe. Protecţia faţă de tulpinile heterologe este slabă sau nulă. Acest efect este determinat de extraordinara variabilitate antigenică a fimbriilor şi a proteinei OMP 2 din membrana externă de la *N. gonorrhoeae*. Au fost descrise sute de serotipuri de fimbrii, precum şi posibilitatea apariţiei unor modificări antigenice atît în cursul cultivării *in vitro*, cît şi în cursul infecţiilor naturale. Concluzia, cel puţin temporară, este că în acest caz chiar un vaccin polivalent are doar o valoare limitată, din cauza variaţiei antigenice care apare rapid *in vivo*. Variaţiile în structura proteinelor de suprafaţă sînt corelate cu variaţii în proprietăţile adezive ale bacteriilor. De aceea, ele permit diferitelor variante să colonizeze selectiv suprafaţa mucoaselor. După Abraham şi Beachey (1985), variaţiile antigenice produse *in vivo* ar fi o manifestare a răspunsului imun al gazdei dirijat faţă de epitopii specifici. În felul acesta, presiunea imună ar putea accelera evoluţia sau selecţia unor noi variante antigenice.

Levine şi colab. (1983) au arătat că administrarea parenterală a fimbriilor de tip 1 de la *E. coli* determină apariţia unui titru ridicat de anticorpi serici, dar nu protejează de colonizarea bacteriilor în mucoasa gastrointestinală. Fenomenul s-ar datora faptului că anticorpii antifimbrii nu ating concentraţii suficient de mari pentru a fi eficienţi la nivelul mucoaselor.

Scholnick şi colab. (1982) au arătat că deşi prezintă o mare heterogenitate antigenică, fimbriile de la *N. gonorrhoeae* au regiuni cu mari asemănări în secvenţa aminoacizilor din structura fimbrilinei. Cele mai multe variaţii apar în structura primară a regiunii —COOH terminală, în timp ce regiunea NH_2 terminală este aparent invariantă. Într-o formă concentrată, obţinută fie prin clivarea proteinei naturale, fie prin sinteză chimică, această regiune ar putea reprezenta, în viitor, un vaccin potenţial.

În stadiul actual, cel puţin în cazurile citate, obţinerea unui vaccin anti-adezine cu spectru larg reprezintă o problemă de nedepăşit din cauza variantelor numeroase ale adezinelor. Un alt motiv de insucces este reprezentat de concentraţia mică a anticorpilor antifimbrii la nivelul mucoaselor (Abraham şi Beachey, 1985).

Vaccinurile sintetice

„În aspectele sale fundamentale, drumul spre sinteza vaccinurilor este pavat"

R. ARNON, M. SHAPIRA, C. O. JACOB

Vaccinurile sintetice conţin secvenţe polipeptidice sintetizate pe cale chimică, reprezentînd determinanţii antigenici esenţiali pentru inducţia unui răspuns imun protector specific faţă de agenţi patogeni corespun-

zători. Ideea utilizării lor este, în primul rînd, o consecință a cercetărilor privind bazele moleculare ale imunogenității, antigenele artificiale, posibilitatea stabilirii secvenței aminoacizilor și a sintezei structurilor polipeptidice. În al doilea rînd, un alt factor esențial a fost reprezentat de demonstrarea faptului că deși macromoleculele proteice sau glicoproteice din structura virusurilor, bacteriilor și paraziților poartă un număr mare de determinanți antigenici, care, în ansamblu, le conferă personalitatea biochimică, numai un număr limitat dintre aceștia sînt semnificativi pentru imunogenitate și un număr și mai mic au rol în inducția unui răspuns protector.

Fenomenul a fost sesizat cel dintîi de Anderer (1963). Testînd antigenitatea diferitelor fragmente peptidice ale proteinei capsidale a virusului mozaicului tutunului (PVMT), el a demonstrat că numai cîteva sînt imunogene și anume cele localizate spre capătul C-terminal al acesteia. Utilizînd ca antigen (după legare de o moleculă-purtător ca albumina serică bovină) hexapeptidul C-terminal, Thr-Ser-Gly-Pro-Ala-Thr, obținut prin clivarea enzimatică a PVMT, a evidențiat capacitatea acestuia de a induce la iepure apariția anticorpilor care precipită antigenul omolog și, la un titru mai mic, chiar virusul intact. Anticorpii au și un efect neutralizant relativ redus, marcat de capacitatea lor de a bloca parțial producerea leziunilor la o plantă sănătoasă. Deși hexapeptidul provenea dintr-o proteină naturală, el este, din punct de vedere chimic, echivalent unei structuri similare sintetice.

Alte observații experimentale, deși lipsite de aplicabilitate directă, au sugerat posibilitatea utilizării peptidelor din structura diferitelor antigene în practica vaccinării.

Fagul ARN MS-2, care produce infecții litice la *E. coli*, are o capsidă alcătuită din 180 de polipeptide identice, fiecare format din 129 aminoacizi. Proteina fagică poate fi clivată cu BrCn, la nivelul Met88 și Met108, cu eliberarea a trei peptide, notate P1 (10 kdal), P2 și P3 (avînd fiecare 2 kdal.) Sela și colab. (1975) au demonstrat că în timp ce peptidul P1 este inactiv, complexul P2 + P3 inhibă neutralizarea fagului MS2, cu un efect aproximativ egal cu cel al capsidei virale normale. Aceasta demonstrează implicarea P2 și P3 în recunoașterea virusului de către anticorpii neutralizați. După ce au fost sintetizate separat, s-a demonstrat că P3 (corespunzînd aminoacizilor 108—129) este inactiv, în timp ce P2 (88 — 108) este imunogen. După conjugare cu o moleculă-purtător macromoleculară sintetică [P2—A-L], respectiv poli(DL-alanil) — poli(L-lizină), peptidul 2 a indus la iepure anticorpi, care neutralizează efectul litic al fagului MS-2, aproape la fel de eficient ca proteina normală de înveliș. Experiența demonstrează pentru prima dată că determinanții antigenici sintetici, care corespund regiunilor imunoactive ale proteinelor naturale, produc un răspuns imun față de proteinele virale intacte și, ca urmare, pot fi utilizați ca vaccin (Langbeheim, Arnon și Sela, 1976).

Lizozimul obținut din albușul oului de găină furnizează un alt exemplu. Arnon, Sela și colab. (1971, 1980, 1982) au identificat în structura lui o regiune imunologic activă, expusă pe suprafața moleculei și consi-

derată ca un determinant antigenic dependent de conformaţie (fig. 310). Recent, Darsley şi Rees (1985) au stabilit, cu ajutorul anticorpilor monoclonali, că această regiune conţine trei epitopi. După determinarea secvenţei aminoacizilor, regiunea imunologic activă a fost sintetizată chimic

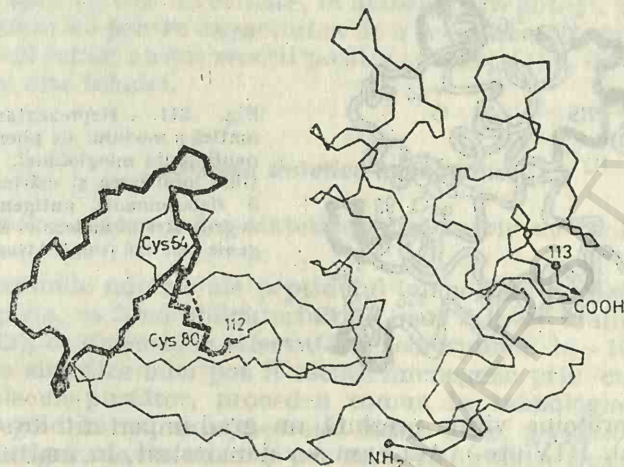


Fig. 310. — Structura tridimensională a lizozimului din albuşul de ou, evidenţiind prezenţa unei bucle izolate, „blocată" printr-o legătură covalentă între două resturi de cisteină. Produsă sintetic, ea induce anticorpi ce recunosc molecula nativă (după Arnon şi Sela, 1983).

şi legată de o moleculă-purtător sintetică, reprezentată de un polimer ramificat, în care catenele laterale de poli(DL-alanină) au fost legate de un „schelet" de poli(L-lizină). S-a obţinut un conjugat integral sintetici imunogen, care induce formarea unor anticorpi ce reacţionează cu lizozimul natural, datorită capacităţii lor de a recunoaşte determinantul dependent de conformaţie din molecula intactă.

Antigenul carcinoembrionar este o glicoproteină cu gm. 200 kdal, caracteristică pentru cancerul de colon. Peptidul sintetic, corespunzînd numai la 11 aminoacizi din porţiunea NH_2-terminală a moleculei, cuplat cu un purtător macromolecular (albumina serică bovină) stimulează producerea de anticorpi. Aceştia reacţionează atît cu peptidul sintetic, cît şi cu molecula întreagă, putînd astfel servi în diagnostic, pentru a evidenţia prezenţa antigenului în serul bolnavilor.

Identificarea determinanţilor antigenici imunogeni

Condiţia esenţială pentru obţinerea vaccinurilor sintetice este de recunoaştere riguroasă a structurii chimice a determinanţilor antigenici şi de stabilire a regiunilor eficiente, cu rol în protecţie şi neutralizare. Unele particularităţi fizico-chimice ale proteinelor sugerează amplasarea

potențială a determinanților antigenici. Astfel, analiza cristalografică în raze X a structurii tridimensionale a proteinelor poate furniza informații utile, deoarece determinanții antigenici esențiali sînt localizați la „colțurile" expuse pe suprafața moleculei pliate în spațiu (fig. 311).

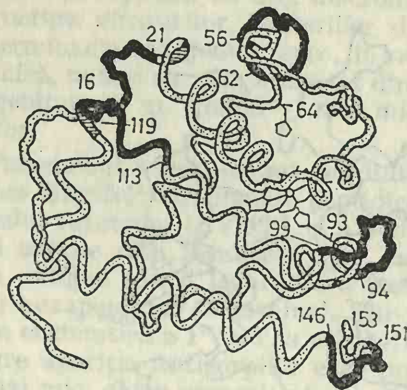


Fig. 311. — Reprezentare schematică a modului de pliere a polipeptidului mioglobinei, evidențiind localizarea și mărimea celor 5 determinanți antigenici (în negru). Restul moleculei este antigenic inactivă (după Attasi, 1975).

Multe proteine virale prezintă un grad important de variabilitate (virusul gripal, HIV etc.). Așa cum s-a demonstrat, în mai multe cazuri, regiunile variabile și hipervariabile ale unor proteine virale au o semnificație imunologică particulară. Astfel, Bittle și colab. (1982), care au studiat secvența aminoacizilor în proteina VP1 a virusului febrei aftoase, la diferite tulpini, subtipuri și serotipuri, au evidențiat localizarea epitopilor esențiali în regiunile majore de variabilitate (41 — 60 ; 134 — 158 ; 195 — — 213). Peptidele corespunzînd secvențelor 134 — 160 și 210 — 213 induc un răspuns intens în anticorpi neutralizanți. Regiunea 41 — 60, deși variabilă, este neimunogenă (nu produce anticorpi capabili să recunoscă particulele virale), probabil deoarece este hidrofobă și „ascunsă" în forma pliată a VP1.

Structura regională a catenei peptidice are, de asemenea, o importanță deosebită. Regiunile α-helicale sau β-rotite („β-turns") pot furniza particularități de suprafață care măresc antigenitatea, comparativ cu β-plierea („β-sheet"). Regiunile hidrofile, datorită tendinței de a se orienta spre suprafața moleculelor, sînt mai probabil asociate cu antigenitatea, în comparație cu regiunile hidrofobe „îngropate" în structura moleculei. De altfel, majoritatea peptidelor sintetice ce reproduc regiuni ale proteinelor naturale reprezintă regiuni hidrofile ale proteinelor intacte.

Localizarea și selecția propriu-zisă a determinanților antigenici se bazează pe mai multe tehnici :

1) Studiul activității fragmentelor are la bază izolarea și purificarea proteinei naturale, urmate de clivarea ei pe cale chimică sau enzimatică. Fragmentele obținute sînt testate separat pentru activitatea lor imunogenă. Antiserul produs este analizat în raport cu virusul sau cu toxina intacte.

2) Utilizarea anticorpilor monoclonali permite, de asemenea, identificarea și selecționarea celor mai mici componenți ai antigenului care au încă o capacitate specifică de legare cu anticorpii.

3) Localizarea situsurilor antigenice cu ajutorul seturilor de peptide ce se suprapun („Overlapping peptides”) este folosită frecvent cu rezultate deosebit de bune. Tehnica are la bază principiul sintezei unei proteine integrale, sub formă de fragmente, ale căror extremități se suprapun, după care se determină separat capacitatea lor imunogenă. Astfel, proteina VP1 a virusului febrei aftoase a fost sintetizată sub forma a 208 hexapeptide, fiecare suprapus cu cele învecinate, la ambele extremități, printr-un aminoacid. Examinate pentru capacitatea de a reacționa cu antiserul produs față de virusul intact au dat reacții pozitive numai două, dovedite ca imunogene și cu alte tehnici.

Peptidele sintetice imunogene

Producerea vaccinurilor sintetice ridică o serie de probleme în curs de rezolvare :

Dimensiunile minime ale peptidului imunogen au fost stabilite, în prezent empiric, ca fiind obligatoriu mai mari de șase aminoacizi. După Lerner (1982), o dimensiune adecvată ar corespunde la ~15 aminoacizi. Fragmentele sintetice mici pot fi făcute imunogene prin cuplarea lor cu diferite molecule-purtător, procedeu comun în tehnologia vaccinurilor sintetice. Peptidele mai mari, teoretic foarte utile, prezintă două inconveniente : sînt greu de sintetizat și pot lua o conformație fixă, deosebită de cea din proteina naturală.

Conformația peptidelor

Configurația spațială a peptidelor are un rol esențial în activitatea lor. Anticorpii induși de proteinele naturale pot recunoaște două categorii de determinanți antigenici :

1) *Determinanții continui* („Continuous determinants”, Astassi și Smith, 1978) sau secvențiali, alcătuiți dintr-o secvență continuă de resturi de aminoacizi, care conferă reactivitatea antigenică a unei porțiuni limitate din moleculă. Ei sînt prezenți în structura polizaharidelor, a proteinelor fibrilare și a acizilor nucleici monocatenari.

2) *Determinanții discontinui* („Discontinuous determinants”) sau conformaționali, alcătuiți din resturi de aminoacizi, care nu sînt adiacenți în structura primară a polipeptidului, dar pot fi juxtapuși în structura tridimensională a proteinei pliate. Ei reprezintă imensa majoritate a determinanților proteinelor globulare și a acizilor nucleici naturali și au un rol esențial în imunogenitate. Sînt foarte greu de sintetizat.

Marea majoritate a peptidelor sintetice sînt, în esență, scurte porțiuni lineare, bazate pe o secvență continuă de aminoacizi, produsă după un model reprezentat de un fragment din structura primară a proteinei. Ele nu realizează particularitățile conformaționale ale determinanților naturali, ci au fie structura determinanților secvențiali (lineari), fie o structură care nu

este întîlnită normal ca imunodominantă în proteina naturală (Reagen, 1985). Aceasta explică imunogenitatea relativ redusă a peptidelor sintetice.

Ameliorarea eficienței lor ca vaccinuri depinde, în mare măsură, de diminuarea flexibilității și de mimarea conformației naturale. Or, peptidele formate din mai puțin de 20—30 de aminoacizi sînt prea mici pentru a prezenta o conformație stabilă în medii apoase. Ele sînt prezentate sistemului imunitar ca un șir continuu de forme antigenice (Rowlands, 1986).

Tehnicile care limitează spectrul de conformații pe care îl poate lua un peptid mic și încearcă să optimizeze interacțiunile anticorpilor produși de el cu forma naturală „corectă" sînt empirice. Ele includ, în primul rînd, introducerea de legături —S—S—. Dreesman și colab. (1984) au obținut o îmbunătățire semnificativă a antigenității unui peptid sintetic (corespunzător aminoacizilor 122—137 din structura antigenului de suprafață a virusului hepatitei B) prin ciclizarea lui, cu ajutorul celor două grupări tiol ale moleculelor de cisteină prezente în secvență.

Un alt procedeu implică înlocuirea anumitor aminoacizi din secvență cu resturi de prolină. După cum a arătat Brown (1984), resturile de prolină sînt mai ușor recunoscute de anticorpi, deoarece ele au mai degrabă o legătură imidă decît una amidă. Ca urmare, diferiții atomi care înconjură acest aminoacid au între ei o relație tridimensională, ușor de recunoscut.

Necesitatea unei molecule-purtător

În cele mai multe cercetări experimentale, antigenele sintetice peptidice au fost cuplate cu o moleculă de proteină-purtător. Deși a fost folosită o gamă largă de proteine, rezultate foarte bune s-au obținut, în special, cu hemocianina din Megathura (KHL), probabil datorită dimensiunilor mari ale moleculei și caracterului străin pentru animalele de laborator. Se utilizează ~ 30 de copii ale peptidului sintetic per 20 de aminoacizi din molecula de proteină. Cuplarea se face cu glutaraldehidă sau prin intermediul unei grupări tiol a unui rest de cisteină adăugat la o extremitate a secvenței.

Au mai fost folosite ca purtători : anatoxina tetanică, unele polimere sintetice ramificate sau peptide polimerizate etc.

Deși după Rowlands (1986), legarea peptidelor sintetice din vaccinuri de molecule-purtător complexe nu este o necesitate absolută, ele au o serie de efecte benefice de intensificare a răspunsului imun prin : 1) mărirea dimensiunii particulei imunogene ; 2) creșterea diversității epitopilor și 3) probabil, prin limitarea flexibilității lui, care favorizează apariția unei varietăți mai limitate de determinanți potențiali.

Vaccinuri sintetice antibacteriene

Vaccinul antidifteric. Determinantul imunogen al toxinei difterice este reprezentat de un tetradecapeptid, situat la extremitatea NH_2-terminală, corespunzător regiunii 188—201, cu structura unei bucle produsă de o legătură disulfidică.

Utilizat ca atare sau sub forma unui hexadecapeptid (186—201), după cuplare cu o proteină naturală sau cu un copolimer sintetic, induce anticorpi la cobai (Audibert, Chedid, Sela şi Arnon, 1982). Anticorpii produşi se combină specific cu toxina difterică şi îi neutralizează efectele dermonecrotic şi letal.

Vaccinul antiholeric. Toxina holerică este formată din două subunităţi peptidice : 1) subunitatea A, care activează adenilatciclaza şi amorsează activitatea biologică ; 2) subunitatea B, care poartă determinanţii cu rol în imunogeneză şi protecţie. Ea asigură legarea de receptorii celulari. Jacob, Sela şi Arnon (1979, 1983) au sintetizat şase peptide diferite, corespunzînd peptidului B. Peptidele CTP1 („CT-Cholera toxin"), corespunzînd secvenţei 8—20, şi CTP3, corespunzînd aminoacizilor 50—64, sînt cele mai active.

Anticorpii produşi sub acţiunea lor neutralizează toxina la nivel biochimic (capacitatea de a induce activarea adenilatcilazei) şi la nivel biologic (suprimă capacitatea de a induce secreţia de lichide într-o ansă intestinală legată şi de a produce permeabilizarea pielii) (Arnon şi Sela, 1985). Ei interacţionează atît cu toxina intactă, cît şi cu subunitatea B.

Arnon şi Sela (1986) au folosit şi tehnologia ADN recombinant. Clonînd gena ce codifică peptidul CTP3 în gena β-galactozidazei la *E. coli* ei au produs astfel o proteină hibridă CTP3—β-gal. Iepurii imunizaţi cu ajutorul ei sînt puternic protejaţi atît faţă de toxina termolabilă, cît şi faţă de toxina holerică integrală.

Proteina M este prezentă pe suprafaţa celulelor virulente de *Streptococcus pyogenes* grup A, cărora le conferă rezistenţă la fagocitoză. Segmentul imunogen, avînd 35 de aminoacizi, sintetizat de Beachy şi colab. (1981), induce la iepure un răspuns imun activ umoral şi celular faţă de proteina întreagă. Anticorpii produşi opsonizează bacteriile aparţinînd aceluiaşi serotip şi favorizează eliminarea lor din organism.

Vaccinurile sintetice antivirale. Studiul lor este într-o fază incipientă, în special datorită dificultăţilor de identificare şi selecţie ale determinanţilor cu rol în protecţie.

Vaccinul sintetic antihepatită B. Hepatita B reprezintă una din afecţiunile pentru care vaccinurile sintetice apar ca deosebit de indicate. Lerner şi colab. (1981) au studiat 13 peptide, a căror secvenţă acoperă aproximativ 220 de resturi de aminoacizi din structura hemaglutininei. Cel mai activ a fost peptidul corespunzînd secvenţei 95—109. Hoop şi Woods (1981) au optat pentru peptidul 138—149, iar Dreesman şi colab. (1982), pentru secvenţa 117—137. În sfîrşit, Bhatnagar şi colab. (1982), care au studiat proprietăţile imunogene a şapte peptide, consideră că nonapeptidul cu secvenţa 139—147 ar fi cel mai bun pentru producerea vaccinului sintetic, deoarece reprezintă partea esenţială a unui determinant antigenic al antigenului HBsAg, comun tuturor serotipurilor de virus HB studiate.

Vaccinul sintetic antigripal este considerat, de unii cercetători, ca reprezentînd o soluţie pentru marea variabilitate a virusului, sub forma

unui vaccin multivalent, capabil să producă protecție încrucișată față de un număr cît mai mare de tulpini (Arnon și Sela, 1985).

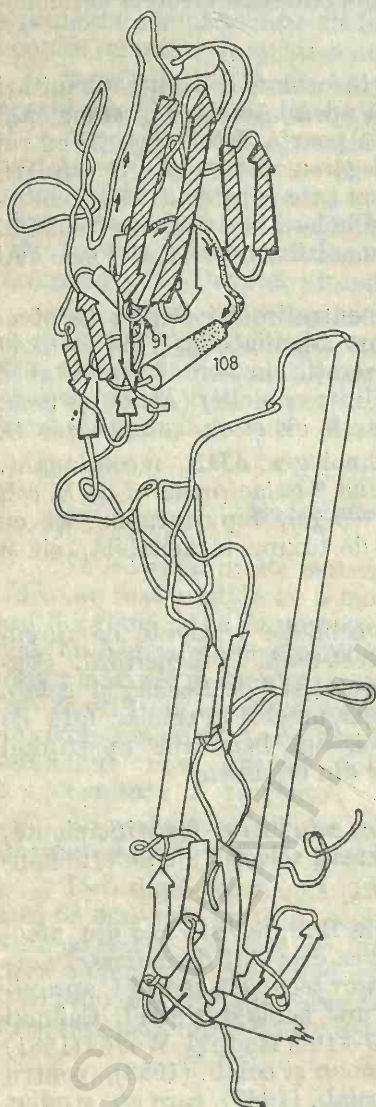


Fig. 312. — Reprezentare schematică a structurii tridimensionale a hemaglutininei virusului gripal, evidențiind poziția regiunii invariante, reprezentată de aminoacizii 91 — 108, ce poate fi folosită ca vaccin sintetic polivalent (activ pe mai multe tulpini diferite de virus) (după Baily, 1981).

Rezultatele cele mai bune au fost obținute cu peptidul sintetic corespunzător secvenței 91—108 din structura hemaglutininei de tip H_3N_2, care ar fi comună la cel puțin nouă tipuri de virus studiate (fig. 312). După Wiley și colab. (1981), această secvență ar corespunde unei regiuni pliate în structura tridimensională a moleculei polipeptidice, expusă pe suprafața hemaglutininei. Caracterul său imunogen este sugerat și de prezența în secvență a trei molecule de tirozină și trei de prolină.

Cuplat cu toxoidul tetanic, peptidul sintetic induce un răspuns imun intens la șoarece și la iepure. Anticorpii produși reacționează atît cu peptidul sintetic, cît și cu mai multe tulpini de virus A. Efectul lor protector a fost demonstrat prin: 1) capacitatea de a bloca infecția sau de a diminua gravitatea ei la animalele (șoarecii) imunizate; 2) efectul neutralizant *in vitro*; 3) interferența cu multiplicarea virusului în culturi de celule (reducerea cu 60 % a numărului unităților formatoare de plaje).

Avantajele vaccinurilor sintetice sînt numeroase și includ, în primul rînd, posibilitatea de a fi produse în cantități mari.

Au un caracter chimic bine definit, sînt lipsite de toxicitate și nu prezintă nici un risc pentru organismele vaccinate sau pentru populație.

Datorită purității lor, este eliminat riscul imunizării cu proteinele neesențiale, care contaminează vaccinurile convenționale și care sînt, frecvent, cauza unor reacții secundare nedorite.

Aprofundarea cunoștințelor privind imunogenitatea peptidelor specifice deplasează tehnologiile de producere a vaccinurilor în domeniul ingineriei moleculare. Aceasta implică posibilitatea construcției unor complexe moleculare care conțin determinantul imunogen selecțio-

nat şi purtătorul molecular ce asigură o eficienţă mare asociate cu un adjuvant inofensiv.

Permiţînd introducerea unor grupări chimice care măresc imunogenitatea, vaccinurile sintetice pot rezolva şi problema adjuvanţilor, înlocuindu-i pe cei convenţionali, care produc multe efecte secundare neplăcute, cu substanţe inofensive sau mult mai puţin periculoase. Se pot realiza astfel vaccinuri cu adjuvanţi intrinseci (,,Built-in adjuvanticity'').

Vaccinurile sintetice pot fi multivalente, datorită posibilităţii de a lega pe aceeaşi moleculă-purtător mai multe peptide, reprezentînd determinanţii imunogeni ai mai multor agenţi patogeni diferiţi (virusuri, bacterii, protozoare). În sfîrşit, vaccinurile sintetice oferă posibilitatea introducerii prompte în structura lor, cu ajutorul tehnicilor de inginerie moleculară, a modificărilor induse de fenomenele de variaţie antigenică atît de frecvente în cazul unor virusuri sau bacterii.

Inducţia anticorpilor faţă de situsurile imunogene ,,ascunse''. Experimental s-a demonstrat că moleculele naturale intacte produc, comparativ cu dimensiunile lor, o gamă restrînsă de anticorpi, cu specificitate limitată la acei determinanţi antigenici care sînt expuşi şi disponibili *in vivo*. Lerner (1982) a semnalat posibilitatea antigenelor sintetice de a induce formarea de anticorpi faţă de determinanţi antigenici ,,ascunşi'' (,,Immunorecessive sites''), care ,,nu se văd'' în moleculele naturale respective (fig. 313). În multe cazuri, anticorpii produşi faţă de aceste secvenţe ,,invizibile'' au capacitatea de a neutraliza eficient virusurile şi de a le inhiba infecţiozitatea.

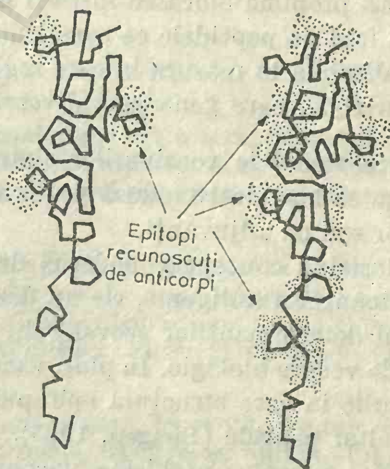


Fig. 313. — Reprezentare schematică a avantajelor utilizării peptidelor sintetice în vaccinare. Imaginea prezintă determinanţii antigenici recunoscuţi de anticorpii produşi de molecula întreagă, nativă (stînga), şi a celor recunoscuţi de anticorpii produşi prin imunizare cu secvenţele peptidice sintetizate echivalente (dreapta) (după Lerner, 1982).

Fenomenul a fost ilustrat de Green şi colab. (1982) în cazul hemaglutininei gripale (HA). Ei au arătat că diferite peptide sintetice, reprezentînd ~ 75 % din structura acesteia, induc apariţia de anticorpi care reacţionează cu proteina naturală. Peptidele respective corespund atît

domeniului cilindric („Stem domain") normal implantat în membrana externă virală, cît şi „capului" globular al hemaglutininei. Both şi colab. (1983) au demonstrat că anticorpii induşi sub acţiunea proteinei virale native sînt specifici pentru epitopii localizaţi în domeniul globular.

Unul din peptidele corespunzător regiunii-stem a HA este în mod particular activ, inducînd formarea unei concentraţii mari de anticorpi neutralizanţi, care, spre deosebire de anticorpii produşi de HA întreagă, reacţionează încrucişat cu o gamă largă de tulpini de virus diferite (Muller, Shapiro şi Arnon, 1982 ; Rowlands, 1986). Aceasta demonstrează existenţa unor structuri conservate, invariante, în regiunea-stem a HA gripale. Fenomenul are o importanţă deosebită pentru virusurile care prezintă variaţii mari de structură antigenică. Unele domenii ale suprafeţei virale rămîn efectiv invariante pentru a păstra anumite funcţii „vitale" pentru virus, ca, de exemplu, capacitatea de legare de celule. Dacă aceste regiuni normal tăcute sînt relevate, există posibilitatea de a produce cu ajutorul lor, sub formă de peptide sintetice, anticorpi cu spectru larg de reactivitate, care pot inhiba sau anula capacitatea virusului de a se lega de celulele sensibile. Fenomenul este ilustrat, ca un caz particular, de hemaglutininele virusului HIV („Human immunodeficiency virus"), care conţin regiuni constante implicate în legarea virusului de receptorii T4 (CD4), de pe suprafaţa celulelor T_H, şi regiuni variabile şi hipervariabile cu rol în imunogenitate.

După ipoteza „canionului" („Canyon hypothesis"), propusă de Bolognesi (1988), regiunile de legare a virusului HIV, ca şi ale unor picornavirusuri, reprezentate de secvenţe practic invariante, conservate, ar fi protejate între pereţii abrupţi ai unei scobituri adînci în structura glicoproteinei virale (gp 120). Cum aceste regiuni sînt inaccesibile anticorpilor, Bolognesi propune blocarea intrării în „canion" cu ajutorul anticorpilor produşi faţă de peptidele ce constituie marginea lui externă. Propunerea este realizabilă în măsura în care regiunile respective nu includ secvenţe hipervariabile, care generează diversitatea antigenică (Hilleman, 1988).

Dezavantajele vaccinurilor sintetice decurg, în primul rînd, din imunogenitatea lor relativ redusă şi din necesitatea de a le cupla cu molecule-purtător sau cu adjuvanţi.

Ilustrînd concepţia modernă de a vaccina cu structura minimală a determinantului antigenic, ele au dezavantajul de a reprezenta structuri de tipul determinanţilor secvenţiali, care nu sînt cei mai relevanţi din punct de vedere biologic. În plus, vaccinurile sintetice sînt greu de aplicat în cazurile în care structura epitopului este realizată prin interacţiunea mai multor peptide (Reagen, 1985).

Fără a rezolva problema, vaccinurile sintetice (considerate de Bona (1987) ca avînd limitări considerabile în medicina umană) reprezintă un progres evident atît pe plan tehnologic, cît şi pe plan conceptual. Există motive de a le considera o cale de perspectivă pentru îmbunătăţirea vaccinurilor existente şi mai ales pentru obţinerea unor vaccinuri noi, faţă de boli lipsite în prezent de orice produs specific de prevenire.

Vaccinurile produse prin tehnici de inginerie genetică

Tehnicile de inginerie genetică și în particular tehnologia ADN recombinant *, una dintre cele mai importante descoperiri ale biologiei contemporane, au oferit, de la început, perspectiva unor noi strategii de obținere a vaccinurilor în special antivirale și antiparazitare. În acest scop, pînă în prezent au fost abordate două căi diferite.

Producerea de vaccinuri „subunitare cu ajutorul tehnologiei ADN recombinant

Tehnica folosită este analogă celei practicate curent prin clonarea genelor ce codifică diferite proteine utile (hormoni, interferoni, factori de coagulare) în celulele bacteriene, levuri sau mai rar în celule de mamifere. Utilizarea ei presupune cunoașterea exactă a determinanților antigenici cu rol în protecție și în funcție de aceasta structura genei sau a genelor care controlează sinteza lor. Tehnica are la bază, în principiu, următoarele etape:

1) identificarea genei;

2) obținerea ei prin sinteză chimică sau pe cale biologică;

3) inserția într-un vector sau vehicul (de regulă, o plasmidă sau alt purtător adecvat);

4) introducerea și integrarea ei în genomul celulei-gazdă, în condiții care să-i asigure exprimarea și funcționarea normală;

5) cultivarea celulei hibride;

6) sinteza substanței dorite;

7) izolarea și purificarea ei.

Clonarea genelor în celulele bacteriene are o serie de avantaje decurgînd din randamentul mare de producție (după Davies (1985) peste 100 de doze/litru), ritmul rapid de sinteză și prețul de cost scăzut. Procedeul are cîteva dezavantaje mari:

1) Numeroase cercetări au demonstrat necesitatea glicozilării proteinelor, cel puțin în cazul antigenelor virale, ca o precondiție a activității lor (Alexander și Elder, 1986). Or, celulele bacteriene nu au capacitate de glicozilare și de modificare a proteinelor consecutivă traducerii informației genetice.

2) Datorită capacității mari de sinteză, frecvent, proteinele străine sînt depuse în celula bacteriană în forme insolubile, reduse și denaturate adesea sub formă de depozite granulare, cum s-a demonstrat la *E. coli*. Utilizarea lor implică extracția și dizolvarea „granulelor" într-un agent chaotrop (uree sau guanidină hidroclorică), prin care ajung în soluție într-o conformație pliată aleatoriu. În mod ideal, utilizarea lor cu efecte

---

* Vezi *Tratat de microbiologie generală*, vol. III, p. 561.

optime implică renaturarea prin pliere parţială, tehnică accesibilă în prezent, pe plan mondial unui singur laborator.

3) Frecvent, produşii de sinteză străini sînt degradaţi în celulele bacteriene sau acumularea lor exercită efecte toxice asupra acestora (Rowlands, 1986).

Clonarea genelor în celulele de levuri are avantajul obţinerii unui produs glicozilat, secretat în mediu şi cu o antigenitate mare. Randamentul producţiei este însă mic în comparaţie cu cel al bacteriilor.

Clonarea genelor în celulele de mamifere asigură sinteza unui produs corect glicozilat şi cu o antigenitate bună.

Dezavantajele ţin de randamentul scăzut, de condiţiile mai dificile de cultură şi de preţul de producţie mult mai ridicat.

Rezultatele tehnicilor de producere a vaccinurilor subunitare prin clonare sînt contradictorii.

Astfel, antigenul HBsAg din virusul hepatitei B obţinut prin clonare în *E. coli* este produs în cantităţi mici şi are un efect protector slab (Stahl şi colab., 1982). În schimb, cel produs pe levuri *(Saccharomyces cerevisiae)*, de către Valenzula (1982), ca şi pe celulele de mamifere, avînd o formă şi o structură asemănătoare celui din virionul nativ, s-a dovedit bun imunogen. Rezultate bune s-au obţinut prin clonarea genei care codifică sinteza proteinei VP1 din structura virusului febrei aftoase. *E. coli* produce în cantităţi mari o proteină himeră, care utilizată experimental ca vaccin protejează taurinele faţă de inocularea de probă cu virus virulent. În sfîrşit, Liew (1985) citează ca un succes deosebit singurul vaccin bacterian comercializat datorită capacităţii mari protectoare pînă la acea dată, obţinut prin tehnici de clonare : vaccinul faţă de tulpinile enterotoxigene de *E. coli* (ETEC), care colonizează intestinul subţire al purceilor şi altor animale, precum şi al omului. Aceste tulpini secretă enterotoxine termostabile (TS), neimunogene şi termolabile (TL), puternic imunogene. Toxinele TL sînt compuse din două subunităţi, una neimunogenă, enzimatică (A), activă, răspunzătoare de activitatea toxică a proteinei, şi alta imunogenă (B), care asigură legarea subunităţii A de celulele epiteliului intestinal. Dallas, Gill şi Falkow (1979) au clonat genele pentru toxina TL prin transfecţie în *E. coli K 12*, după ce au produs o deleţie în secvenţa ce codifică subunitatea A şi au legat înaintea genei B un promotor foarte activ. După recombinare, *E. coli K 12* produce cantităţi mari din peptidul B, în formă de toxoid. Administrat ca vaccin, după purificare, induce o protecţie solidă faţă de toxina ETEC. Tehnologia este importantă pentru că poate fi utilizată pentru producerea de vaccinuri de tip toxoid, prin recombinare faţă de alte bacterii patogene.

Tehnologia ADN recombinant este folosită şi pentru producerea vaccinului antimalaric, cu toate dificultăţile decurgînd din ciclul de viaţă complex şi existenţa a trei stadii antigenic distincte, fiecare, teoretic, susceptibil să intervină în procesele imunitare. Clonarea mai multor gene de la *Plasmodium falciparum* a permis izolarea unor peptide imunogene, a căror capacitate protectoare variază în funcţie de sistemul gazdă — parazit în care au fost testate (Brown, 1984). Dificultatea majoră este repre-

zentată de marea diversitate antigenică și rearanjările genetice, care permit parazitului să evite efectele răspunsului imun (Mitchell, 1987).

Antigenele produse prin tehnici de inginerie genetică au o serie de avantaje decurgînd din puritatea și stabilitatea lor, absența efectelor secundare și a riscului de infecțiozitate. Pot fi produse în cantități mari, chiar pentru agenții patogeni cu serotipuri multiple. Tehnica permite clonarea secvenței corespunzătoare unei regiuni antigenice (vaccin subunitar) sau chiar a unei regiuni ample din genomul agentului patogen.

În stadiul actual, capacitatea lor protectoare este inferioară celei a vaccinurilor inactivate totale și evident mult mai mică decît cea a vaccinurilor atenuate. Această particularitate se explică prin incapacitatea lor de a stimula mecanismele imunității mediate celular și de a activa eficient macrofagele.

Vaccinurile subunitare în purtători heterologi atenuați

Sub această denumire a fost descrisă o metodă alternativă de utilizare a ingineriei genetice în producerea de vaccinuri subunitare. Ea constă în clonarea genelor corespunzătoare și integrarea lor, prin transfecție, în genomul unor purtători heterologi (virusuri sau bacterii) atenuați. După testarea mai multor tipuri de virusuri cu capacități restrictive de replicare s-a ajuns la concluzia că virusul de vaccină „Cowpox virus" este cel mai potrivit pentru scopul propus (Mackett, Smith și Moss, 1982; Panicali și Paoletti, 1982).

În sprijinul acestei opțiuni, Paoletti (1986) aduce următoarele argumente:

1) Virusul vaccinei este capabil de replicare eficientă în organismul uman, fapt demonstrat prin practica îndelungată a vaccinării antivariolice.

2) Virusul manipulat genetic nu circulă în natură și în absența unui rezervor de virus natural poate fi folosit fără risc în afara laboratorului.

3) Au fost izolate mai multe tulpini cu virulență atenuată fapt care permite reducerea riscului de reacții secundare.

4) Avînd un genom relativ mare (187 000 pb) poate integra un fragment important de ADN ($\sim$25 000 pb, respectiv circa 20 de gene), fără a-și modifica proprietățile. Ceva mai mult, „spațiul" disponibil pentru grefarea unor gene suplimentare poate fi mărit, prin deleția unui segment genomic neesențial pentru replicare.

5) ADN viral izolat este neinfecțios.

6) Informația genetică străină integrată este pusă sub controlul genomului viral. Ea permite sinteza și eliberarea antigenelor străine, pe care le codifică, și declanșarea unui răspuns imun corespunzător la persoanele vaccinate cu virusul hibrid.

Paoletti (1986) propune următorul protocol pentru construcția virusului hibrid-vector, adaptabil oricărui tip de vaccin:

1) Întrucît genomul virusului Pox este mare, fragil și greu de manipulat *in vitro*, pentru recombinare se folosește un fragment subgenomic selecționat, care este multiplicat prin clonare.

2) Fragmentului genetic străin, selecționat în așa fel încît să conțină cadrul de citire normal al informației genetice, i se adaugă la ambele extremități semnalele de reglare adecvate, care asigură inițierea și respectiv terminarea transcrierii și exprimarea lui după inserție.

3) Astfel pregătite, genele străine sînt grefate în fragmentul subgenomic viral, într-un situs care nu conține informație genetică esențială pentru replicare, după care molecula himeră obținută este introdusă prin transfecție într-o celulă eucariotă.

4) Celula respectivă este infectată cu virusul vaccinal, care își inițiază ciclul de replicare. Cînd moleculele de ADN genomic ale virusului ce se replică vin în contact strîns cu ADN-himeră introdus prin transfecție, are loc un proces de recombinare genetică *in vivo*, între segmentele de ADN vaccinal care flanchează genele străine și secvențele omologe de ADN ale genomului viral replicativ. În felul acesta genele străine, corespunzătoare determinanților antigenici ce trebuie produși, sînt inserate într-o nouă moleculă de ADN genomic. Aceasta intră în rezerva de molecule genomice replicative a celulei și este încorporată în cursul morfogenezei virusului într-o particulă virală matură;

5) Identificarea virionilor care poartă genele străine se poate realiza pe mai multe căi, în funcție de natura caracterelor marcante exprimate de fragmentul de gene străine integrat. Acestea pot fi după caz : a) prezența sau absența unei activități biochimice caracteristice ; b) capacitatea de a codifica o glicoproteină membranară, decelabilă serologic ; c) capacitatea de a modifica o substanță cromogenă d) prezența unei funcții sensibilă la temperatură etc.

Tehnica a fost utilizată cu succes de Paoletti (1984), care a obținut un virus de vaccină-himeră recombinant, care purta gena ce codifică antigenul de suprafață HBsAg al virusului hepatitei B, al cărui rol critic în imunitate este, în prezent, bine cunoscut. Celulele infectate cu acest virus produc cantități mari de HBsAg, cu proprietăți foarte asemănătoare particulelor izolate din celulele de hepatom. Iepurii infectați cu virusul-himeră (vaccină-HBsAg) produc intens anticorpi specifici, la un titru superior celui demonstrat ca protector la om.

Rezultate asemănătoare s-au obținut în cazul virusului gripal, prin grefarea în virusul vaccinal a genelor care codifică hemaglutininele. Animalele inoculate cu glicoproteinele produse sub acțiunea virusului recombinant produc anticorpi ce reacționează specific cu hemaglutinina nativă, neutralizează infecțiozitatea virusului, *in vivo*, în culturi celulare, inhibă aglutinarea hematiilor și protejează animalele imunizate față de inocularea intranazală cu virus virulent.

Avantajele vaccinurilor subunitare în purtători heterologi virali atenuați sînt multiple.

În primul rînd, utilizarea lor este indicată în cazul virusurilor care nu pot fi cultivate *in vitro*, cum este cazul virusului hepatitei. Singurul vaccin existent în prezent față de această boală, disponibil în cantități extrem de mici și la un preț foarte ridicat, este obținut prin concentrarea antigenului HBsAg (purificat, Ø∼22 nm), din plasma purtătorilor cro-

nici. Utilizarea lui este limitată la grupurile cu risc mare de infecție (cercetători, medici) și necesită controale riguroase pentru eliminarea riscului de transmitere a unor virusuri „lente" (inclusiv virusul HIV-SIDA).

Vaccinurile pe bază de virusuri hibride au marele avantaj că reunesc potențialul de replicare al vaccinurilor virale atenuate și prezentarea determinanților antigenici într-o formă naturală. Ele oferă posibilitatea producerii de vaccinuri multivalente, prin grefarea în aceeași particulă purtătoare capabilă de replicare a mai multor gene, de proveniențe diferite. În acest context, apar ca special indicate în producerea de vaccinuri antiparazitare, care trebuie să reunească determinanți antigenici imunogeni, din diferite stadii de viață a parazitului. Ceva mai mult, în perspectivă există posibilitatea grefării, în unele cazuri, a unor gene corespunzătoare factorilor helper, de creștere și diferențiere, mediatori activi ai răspunsului imun. Deși eficacitatea lor este evidentă, răspunsul imun trebuie intensificat. În acest sens, sînt necesare cercetări pentru identificarea secvențelor de reglare, care controlează exprimarea genelor străine.

Dezavantajele vaccinurilor subunitare. Deși complicațiile consecutive vaccinării antivariolice (vaccina generalizată, encefalita postvaccinală) sînt foarte rare, determinate de nerespectarea unor contraindicații (în primul caz vaccinarea bolnavilor cu eczeme) sau de transmiterea accidentală la contacți, această formă de risc este luată în considerație de mai mulți cercetători. Se adaugă temerea de modificare a tropismului virusului-himeră sau de producere a unor substanțe toxigene. Vaccinul este inutilizabil la bolnavi cu deficit imunitar, datorită pericolului de producere a unor infecții diseminate sau a gangrenei vaccinale.

Un alt dezavantaj decurge din faptul că replicarea virusului vaccinal-himeră poate fi limitată la persoanele imunizate (vaccinate anterior), fapt care diminuă rolul lui de „purtător" de gene străine replicabil.

În sfîrșit, însuși efectul de imunizare față de virusul purtător ar putea fi prin interferență un factor limitant pentru exprimarea genelor străine ce condiționează imunogenitatea.

Utilizarea bacteriilor ca purtători heterologi de gene. Rezervele manifestate față de utilizarea virusului vaccinei au stimulat cercetările orientate spre obținerea unor purtători de gene alternativi, care să corespundă în mai mare măsură normelor generale de securitate. În această categorie s-ar afla, după Winther și Dougan (1985), precum și după Liew (1985), tulpinile mutante avirulente, foarte stabile de *Salmonella typhimurium*. Mutantele gal E^- sînt caracterizate prin blocarea enzimei uridindifosfat-galactozo-4-epimeraza, în timp ce la mutantele aro^- este afectată calea comună de biosinteză a aminoacizilor aromatici. Ambele mutante păstrează capacitatea de a pătrunde prin mucoasa epiteliului intestinal, de a stimula sistemul GALT, dar nu se pot replica suficient pentru a afecta țesuturile gazdei. Ele creează o stare de imunitate protectoare solidă, sistemică și la nivelul mucoaselor ce conferă rezistență față de inocularea cu tulpini sălbatice virulente aparținînd atît speciei omologe, cît și *S. dublin*. Aceste tulpini pot fi folosite pentru inducția unei protecții multi-

valente (*Salmonella, Shigella, E. coli*), după introducerea genelor ce codifică determinanţii imunogeni ai acestor bacterii, prin transfecţie sau prin transformare genetică cu ajutorul unor plasmide.

Vaccinurile anti-idiotip

„Anticorpii anti-idiotip pot fi folosiţi pentru a stimula sistemul imunitar să-şi amintească de un antigen pe care nu l-a văzut niciodată"

H. Koprowski, F. Melchers

Demonstrarea capacităţii anticorpilor anti-idiotip de a servi ca înlocuitori ai antigenelor („Surrogate antigens") şi de a stimula specific inducţia unui răspuns imun a deschis calea utilizării lor ca vaccinuri. Ideea, formulată simultan de Nisonoff şi Lamoyi (1981), precum şi de Roitt şi colab., a fost susţinută ulterior de numeroşi cercetători ca o alternativă menită să evite dezavantajele vaccinurilor convenţionale şi chiar ale celor sintetice sau produse prin tehnologii de inginerie genetică.

Conceptual, propunerea se bazează pe teoria reţelei idiotipice a răspunsului imun (Jerne, 1974), iar realizarea în practică va beneficia de tehnologia hibridomului de producere a anticorpilor monoclonali.

Bazele teoretice ale vaccinării anti-idiotipice

În concepţia clasică, sistemul imunitar funcţionează pentru a recunoaşte epitopii de pe celulele sau moleculele provenite din mediul extern, avînd caracter nonself pentru organismul imunocompetent. Răspunsul imun faţă de antigenele proprii este considerat ca o reflectare a unei condiţii anormale, asociată cu o stare de boală autoimună.

Descoperirea idiotipurilor a modificat concepţia clasică în sensul că reactivitatea faţă de self nu este obligatoriu nocivă, ci, mai degrabă, reprezintă o parte integrantă a fenomenelor normale de reglare imunitară. Teoria lui Jerne (vezi cap. „Teoria reţelei idiotipice a sistemului imunitar") postulează că dacă limfocitele şi anticorpii pot recunoaşte potenţial toţi determinanţii antigenici existenţi sau posibili, ei trebuie să recunoască în mod obligatoriu şi regiunile hipervariabile de pe receptorii altor limfocite T şi B. Ca urmare, idiotipul de pe un limfocit poate reacţiona cu anti-idiotipul de pe alte limfocite. Aceste interacţiuni mutuale diotipice se răspîndesc pentru a forma o reţea vastă, care cuprinde întregul repertoriu de limfocite al organismului. Teoria postulează, de asemenea, că atunci cînd paratopul şi idiotipul ocupă acelaşi situs pe molecula de anticorp, sau un situs foarte asociat cu el, respectiv atunci cînd au o structură sau o conformaţie foarte asemănătoare, atunci antigenul (epitopul) şi anticorpul anti-idiotip pot avea o structură globală similară, datorită capacităţii lor de a se lega de anticorp în acelaşi situs (fig. 314).

Experienţa a confirmat existenţa unei clase de anticorpi anti-Id, numită Ac-2β sau anti-idiotip „imagine internă", capabilă să mimeze structura sau forma tridimensională a epitopului de pe antigen, chiar

dacă cele două molecule sînt complet diferite din punct de vedere biochimic. De aici, concluzia posibilității de a stimula limfocitele reactive față de un anumit antigen nu direct, prin intermediul acestuia, ci indirect,

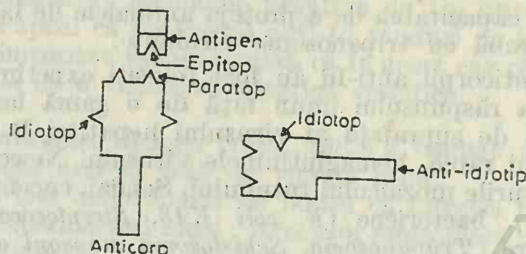


Fig. 314. — Reprezentare schematică a modului în care un anti-idiotop poate mima un antigen. Paratopul este situsul de pe Ac1 care leagă epitopul. El este o „imagine internă" dependentă de interacțiunea regiunilor variabile L și H ale Ig. Idiotopul este un situs extern pe Ac1 care induce producerea antiidiotipului Ac2. Cînd paratopul și idiotopul au o structură sau conformație similară, antiidiotipul indus de idiotopul de pe Ac1 se comportă ca imagine internă. Idiotopul său poate mima structura sau forma epitopului de pe antigen. Idiotopul de pe antiidiotip are potențial de vaccin (după Zhou, Dreesman și Kennedy, 1987).

cu ajutorul imaginii lui interne sau al anticorpilor anti-idiotip, care datorită idiotipului de pe suprafața lor au potențial imunogen. Se creează astfel perspectiva unei noi generații de vaccinuri bazată pe fenomenul de mimare moleculară („Molecular mimicry"), prin care anticorpul ce poartă imaginea internă a antigenului străin, ca parte constitutivă a structurii sale, se comportă ca echivalent antigenului însuși, inducînd sinteza aceluiași tip de anticorpi protectori. Prin acest procedeu, antigenele proprii agenților patogeni din vaccinurile convenționale sînt înlocuite de anticorpii anti-idiotip exogeni, care realizează un proces de vaccinare fără antigen.

Tehnica folosită curent în practică pînă în prezent constă în imunizarea unui animal cu agentul patogen respectiv sau cu constituenții săi și producerea pe această cale a unei prime categorii de anticorpi (Ac1). Aceștia sînt folosiți pentru imunizarea altor animale și producerea unei a doua categorii de anticorpi Ac-2, care conține și anticorpii anti-Id, „imaginea internă" (Ac-2β).

După UytdeHaag și Osterhaus (1985), acest procedeu are, pe lîngă rezervele teoretice evidente, și o serie de dezavantaje practice majore, decurgînd din utilizarea anticorpilor Ac-2 xenogenici sau alogenici. În plus, producerea unei concentrații mari de anticorpi anti-Id Ac-2 este greu de controlat. Produsul respectiv policlonal conține, de regulă, o populație heterogenă de specificități anti-idiotip, în care numai o fracțiune redusă corespunde moleculelor „imagine internă". Ei au utilizat pentru prima dată ca vaccin față de infecția cu *Poliovirus* anticorpi monoclonali anti-Id și consideră că progresele tehnologiei hibridomului vor oferi perspectiva obținerii unor preparate de Ac-2β în concentrații mari și cu un grad înalt de puritate.

Rezultatele utilizării primelor vaccinuri anti-Id

Sacks și colab. (1982) au demonstrat cei dintîi efectul imunogen al Ac-2β. Inițial, ei au produs trei tipuri de anticorpi monoclonali, fiecare

corespunzînd ca specificitate unei glicoproteine majore de suprafață de la *Trypanosoma rhodensiense*. Amestecul lor a fost folosit ca imunogen pentru a produce anticorpi anti-Id Ac-2. Aceștia au fost folosiți ca vaccin, demonstrîndu-se capacitatea de a proteja animalele de laborator față de inocularea de probă cu tripanosome virulente.

Ulterior, anticorpii anti-Id au fost folosiți experimental ca vaccin pentru inducerea răspunsului imun față de o gamă largă de antigene virale (antigenul de suprafață al virusului hepatitei B (HBsAg), glicoproteina virusului rabic, hemaglutininele virusului Newcastle și ale reovirusurilor, virusurile mozaicului tutunului, Sendaï, encefalomielitei ecvine venezuelene etc.), bacteriene (*E. coli K13*, *Streptococcus. pneumoniae*, levani), parazitare (*Trypanosoma*, *Schistosoma mansoni* etc.).

Vaccinul anti-Id contra hepatitei B a fost studiat de Kennedy și Dreesman (1985), care au identificat existența unui idiotip comun în structura anticorpilor umani față de antigenul HBs. Acest idiotip este asociat cu paratopul anticorpilor (Ac1) produși față de acest antigen, deoarece atît antigenul nativ, cît și peptidele purificate din structura lui sau sintetizate inhibă reacția idiotip — antiidiotip.

Anticorpii anti-Id Ac-2 obținuți pe iepure, injectați la doi cimpanzei, au stimulat sinteza de anticorpi capabili să neutralizeze antigenul HBs și i-a protejat față de inocularea cu virus virulent (fig. 315). Cimpan-

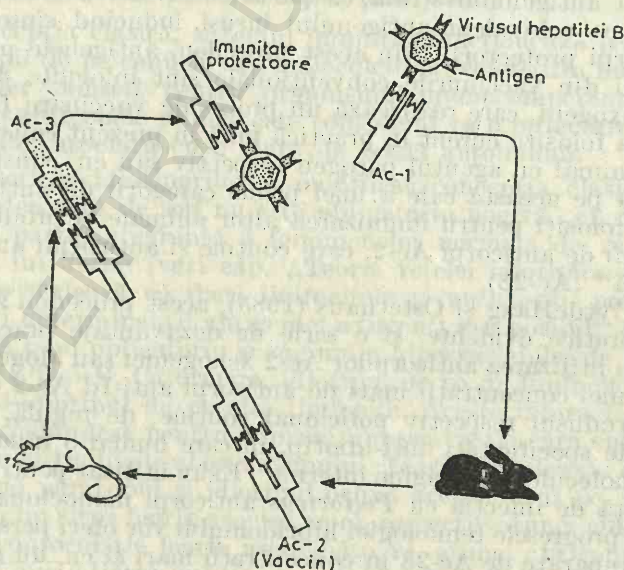


Fig. 315. — Vaccinul antiidiotip contra hepatitei B utilizează imaginea internă a antigenului viral. Anticorpii umani (Ac1) injectați la iepure induc formarea Ac2 (antiidiotip imagine internă cu rol de vaccin). Injectați la șoarece sau la cimpanzeu, produc Ac3 care seamănă structural cu Ac1, chiar dacă diferă biochimic. Ac3 poate reacționa cu virusul, protejînd animalele sensibile față de infecție (după Kennedy, Melnick și Dreesman, 1985).

zeii-martori nevaccinaţi au prezentat semne clinice şi serologice de infecţie. Deşi s-au făcut patru injecţii cu cantităţi importante de anticorpi (mg), nu s-au înregistrat fenomene negative de tip anafilactic sau alte reacţii alergice. Faptul că anticorpii anti-Id produşi pe iepure sînt activi la şoarece şi la cimpanzeu demonstrează că în acest caz răspunsul nu este limitat la animale cu o structură genetică specifică.

Vaccinul antirabic. Reagen (1982, 1985) a studiat acţiunea protectoare a anticorpilor anti-Id faţă de virusul rabic.

Opţiunea a fost determinată de faptul că infecţia rabică ar reprezenta un model experimental ideal : structura moleculară şi patogenitatea virusului, ca şi patogenia bolii sînt bine cunoscute, incubaţia este suficient de lungă pentru a permite vaccinului să stimuleze răspunsul imun mediat umoral şi celular, înainte ca virusul să fie sechestrat în sistemul nervos, există un vaccin eficient pentru comparaţie etc. Din cele cinci proteine structurale ale virusului rabic, glicoproteina din spicule (proteina G) are rol în imunogeneză. Ea participă în inducţia imunităţii mediate celular, în producerea anticorpilor virus-neutralizanţi, cu rol în legarea virusului de receptorii celulari şi în fuziunea dependentă de pH, cu membrana celulară în cursul endocitozei.

Anticorpii anti-Id Ac-2 policlonali induc apariţia unui titru relativ scăzut de anticorpi neutralizanţi, activi faţă de un epitop definit, nelinear. Administrarea anticorpilor anti-Id în asociere cu o cantitate foarte mică de vaccin antirabic standard determină o rezistenţă crescută faţă de inocularea intracerebrală cu virus virulent. Aceste date sugerează că în vaccinarea antirabică anticorpii Ac-2 ar fi indicaţi mai mult ca stimulatori. Vaccinul anti-idiotip este mai slab în acest caz decît cel ce are ca vector virusul vaccinal (Kieny şi colab., 1984), care induce un titru ridicat de anticorpi virus-neutralizanţi, stimulează limfocitele T_C şi protejează faţă de inocularea intracerebrală cu virus de stradă. El ilustrează, totodată, complexitatea problemei şi necesitatea cunoaşterii mai detaliate a interrelaţiilor din reţeaua idiotipică în vederea utilizării ei cu maximă eficienţă.

Avantajele *vaccinurilor anti-idiotipice*

Deşi problema vaccinurilor anti-idiotipice este într-un stadiu incipient, numeroşi cercetători scot în evidenţă avantajele potenţiale, în raport cu celelalte tipuri de vaccinuri.

Spre deosebire de vaccinurile convenţionale, care includ numeroşi determinanţi antigenici diferiţi de cei ce induc imunitate protectoare, vaccinurile anti-idiotip au o specificitate riguroasă şi declanşează un răspuns imun limitat la epitopii a căror imagine internă o poartă. De aceea, nu produc efecte nocive de tip autoimun, ca unele vaccinuri convenţionale ce pot avea determinanţi antigenici în comun cu unii constituenţi celulari. Ele induc un răspuns imun mediat celular mai intens decît vaccinurile inactivate. Cu ajutorul tehnologiei anticorpilor monoclonali pot fi produse în cantităţi mai mari şi pot fi modificate prin aplicarea tehni-

cilor de inginerie moleculară, în vederea perfecționării performanțelor lor. În cazul virusurilor cu mare variabilitate antigenică, un vaccin anti-idiotip față de un determinant antigenic comun celor mai multe tulpini este preferabil unui vaccin viral, care induce protecție numai față de determinanții specifici purtați de tulpinile virale incluse în vaccin.

Vaccinurile anti-idiotip sînt în special indicate la nou-născuți, pentru crearea rezistenței la antigenele glucidice și glucolipidice ale bacteriilor și protozoarelor, care nu pot fi sintetizate chimic și nici produse prin tehnologia ADN recombinant. Stein (1985) a demonstrat că la șoarecii nou-născuți, care nu au imunocompetența necesară pentru a produce un răspuns imun, anticorpii anti-Id determină activarea celulelor B Id$^+$ (specifice pentru idiotip), care devin reactive la antigen. Prin acest mecanism, anticorpii monoclonali anti-Id protejează față de infecția letală cu bacterii care poartă determinanți glucidici. Fenomenul explică ineficiența vaccinurilor convenționale la nou-născuți cu sistem imun imatur: anticorpii anti-Id mimează structura glucidelor de pe suprafața celulelor bacteriene, dar fiind de natură proteică ei induc un răspuns imun.

Au fost semnalate și unele **dezavantaje și limite**, mai ales potențiale. Astfel, din cauza complexității rețelei idiotipice este posibil ca efectul vaccinurilor anti-Id să nu fie totdeauna benefic. Mulți anticorpi anti-Id produc un răspuns echivalent celui dat de antigen, însă alții pot avea efect supresor.

Deși pînă în prezent nu au fost semnalate fenomene negative, nu este exclus ca anticorpii proveniți de la diferite specii animale să producă febră sau reacții de hipersensibilitate la serul heterolog.

În sfîrșit, Kennedy, Melnick și Dreesman (1985) au observat că administrarea anticorpilor anti-Id produși sub acțiunea anticorpilor monoclonali față de virusul herpesului scurtează durata de supraviețuire a șoarecilor vaccinați, după inocularea cu virus virulent.

Între neajunsurile menționate de unii cercetători mai citām faptul că, în unele sisteme, vaccinul produce doar un efect stimulator (rabic) și nu unul protector, precum și riscul de a produce anticorpi față de epitopi cu specificitate necunoscută sau de restricție genetică a inducției imunității în unele sisteme.

Unele obiecții sînt de pe acum irelevante, iar altele sînt normale în stadiul actual al problemei. În măsura în care își vor dovedi în viitor eficiența, vaccinurile anti-idiotip au de partea lor un factor subiectiv important: pentru a proteja față de o infecție virală gravă, este mai liniștitor ca sistemul imunitar să fie „perturbat" de o parte bine definită din proprii săi constituenți decît de vaccinurile convenționale, care conțin agenți patogeni inactivați sau atenuați (UytdeHaag și Osterhaus, 1985).

Substanţele adjuvante ale răspunsului imun

„Putem aprecia, în mod realist, că am intrat efectiv în al doilea secol după Louis Pasteur şi că pentru producerea unor vaccinuri noi este necesară obţinerea de noi adjuvanţi, care nu trebuie să mai aparţină alchimiei, ci trebuie să constituie instrumentele cerute de Ramon, „pentru a înţelege mecanismele intime ale producerii antitoxinelor".

L. Chedid

Deşi interesul pentru utilizarea unor substanţe capabile să amplifice răspunsul imun este vechi (Ramon, 1924) şi lista acestora nu a încetat să crească, aplicaţiile în practica vaccinării umane au rămas limitate la gelurile de hidroxid de aluminiu, introduse de Glenny şi colab. (1926) şi dovedite ca eficiente în imunizarea cu anatoxine.

Adjuvanţii imunităţii sînt substanţe cu mare diversitate chimică, avînd capacitatea de a amplifica răspunsul imun, respectiv de a conferi o protecţie imunitară mai puternică decît cea dată de substanţele imunogene ca atare. Acest efect se poate realiza pe diferite căi, incluzînd mărirea vitezei de apariţie a răspunsului imun, creşterea nivelului acestuia (a concentraţiei anticorpilor sau a imunităţii mediate celular), prelungirea duratei lui, sau prin conversia unei substanţe aparent neimunogenă într-un antigen eficient. Majoritatea adjuvanţilor sînt folosiţi pe baza unor observaţii empirice, care demonstrau capacitatea lor imunostimulatoare. Progresele foarte limitate s-au datorat necunoaşterii mecanismelor prin care acţionează.

După White (1976), sistemul celular considerat ca privilegiat pentru acţiunea adjuvanţilor este sistemul fagocitar mononuclear. Ideea are la bază rolul critic al macrofagelor în imunogeneză, prin funcţia sa de prelucrare şi prezentare a antigenelor către celulele sistemului imunitar. S-a presupus că acţiunea adjuvantului ar fi corelată cu prelungirea persistenţei antigenelor în macrofage, prin diminuarea catabolismului enzimatic normal sau prin influenţa macrofagelor stimulate de adjuvanţi asupra comportamentului imunitar al limfocitelor înconjurătoare.

Rezultatele unor cercetări experimentale au furnizat date contradictorii, în funcţie de natura antigenelor : în timp ce în unele cazuri imunogenitatea suspensiilor de macrofage peritoneale este corelată cu cantitatea de antigen persistent în structura lor, în altele nu există dovezi că prezenţa adjuvantului ar influenţa catabolismul antigenelor în macrofage.

După Chedid (1985), deşi gama substanţelor adjuvante este extrem de heterogenă (tabelul nr. 75), ele pot acţiona pe trei căi majore : 1) prin fenomene de depozit ; 2) influenţînd prezentarea către celulele imunocompetente, respectiv asigurînd o interacţiune eficientă cu celulele T_H şi cu celelalte celule ce asigură producerea optimă de anticorpi şi un nivel ridicat de imunitate mediată celular ; 3) stimulînd producerea de limfokine.

Adjuvanţii convenţionali, reprezentaţi de gelurile de oxid, hidroxid sau fosfat de aluminiu, sînt folosiţi cu rezultate, în general, bune în pro-

Tabelul nr. 75

Clasificarea substanțelor cu funcții de imunopotențare (după Webb Jr. și Winkelstein, 1984)

Clasa	Compușii	Mecanismul de acțiune
Potențare generală (fără specificitate de antigen)	Emulsii apă/ulei; compuși anorganici	Nelămurit. Posibil eliminarea lentă sau întîrziată a antigenului și răspunsul inflamator mărit, asociat
	Polinucleotide sintetice	Stimulează prelucrarea antigenelor și funcția T_H; pot mări funcțiile efectoare; induc sinteza de interferoni
	Medicamente antiinflamatoare nesteroidice	Blochează formarea produșilor de metabolism ai acidului arahidonic (prostaglandine și tromboxani)
	Hormoni, nucleotide ciclice; medicamente care afectează concentrația hormonilor sau a nucleotidelor ciclice	Afectează toate tipurile de celule și toate aspectele răspunsului imun
	Endotoxinele bacteriene	Afectează puternic celulele B și macrofagele; pot activa unele celule T
	Limfokinele (IL-1, IL-2 etc.), factorii de creștere ai celulelor B; factori stimulatori ai coloniilor	Afectează creșterea și diferențierea anumitor subclase de limfocite
Imunopotențare specifică	Factorii helper specifici pentru antigen	Produși ai celulelor T_H, activi direct pe celulele B

ducția unor vaccinuri pentru om sau animale, ca și la prepararea serurilor hiperimune terapeutice. Astfel, anatoxina difterică (ADPA) sau tetanică (ATPA), purificate și adsorbite pe hidroxid sau pe fosfat de aluminiu, conțin maximum 2 mg Al/1 ml.

După Warren, Vogel și Chedid (1986), imunogenitatea crescută a antigenelor precipitate, amestecate sau adsorbite pe săruri de aluminiu s-ar putea explica prin mai multe mecanisme:

1) încetinirea eliminării antigenelor și prelungirea timpului de interacțiune între antigene și celulele care prezintă antigenele ca, de exemplu, macrofagele și celulele dendritice foliculare;

2) atragerea celulelor imunocompetente în regiunea în care s-a făcut injecția;

3) prezența particulelor de săruri de aluminiu în ganglionii limfatici regionali la iepure, după 7 zile de la imunizare, sugerează posibilitatea par-

ticipării lor în dirijarea antigenelor spre regiunile din ganglioni care conțin celulele T;

4) inițierea de fenomene inflamatorii la nivelul ganglionilor limfatici drenanți, cu efect adjuvant;

5) capacitatea hidroxidului de aluminiu de a activa complementul, cu rol inflamator local, avînd drept consecință stimularea producerii de anticorpi și de celule B cu memorie.

Deși vaccinurile din această categorie sînt folosite frecvent la om și la animale fără riscuri, ele nu sînt întotdeauna inofensive. Au fost semnalate ocazional reacții locale neplăcute, precum și atragerea eozinofilelor și inducția sintezei de IgE la locul injecției, deși nu pun probleme speciale legate de apariția unor stări alergice. Un dezavantaj semnificativ decurge din faptul că vaccinurile produse cu acest tip de adjuvanți nu pot fi liofilizate, conservarea lor făcîndu-se exclusiv prin refrigerare. După Warren, Vogel și Chedid (1986), sărurile de aluminiu reprezintă un adjuvant adecvat pentru vaccinurile ce conțin imunogeni puternici, în cazul în care producerea intensă de anticorpi este suficientă pentru protecție. Ele sînt ineficiente în cazul imunogenelor slabe și al infecțiilor a căror prevenire necesită intervenția mecanismelor de imunitate mediată celular.

Adjuvantul Freund complet

Dintre toți adjuvanții cunoscuți și folosiți curent, cel mai activ este adjuvantul Freund complet. Producerea lui de către Freund (1947) are la bază două observații anterioare: prima aparține lui Dienes (1928), care a observat că injectarea unui antigen (ovalbumina) într-o leziune tuberculoasă este urmată de o creștere evidentă a titrului anticorpilor. Cea de-a doua este datorată lui Couland și Saenz (1935), care au arătat că sensibilizarea la tuberculină este facilitată de înglobarea antigenului în ulei mineral.

Adjuvantul Freund complet este obținut prin emulsionarea antigenului aflat în soluție apoasă în ulei de parafină (înalt rafinat, stabil, lipsit de componenți nesaturați) cu ajutorul unui emulgator (monooleat de manitol-Arlacel A sau B, lanolină anhidră etc.). Final, se încorporează celule bacteriene omorîte aparținînd unei specii de *Mycobacterium* (*M. tuberculosis* de tip uman, bovin sau aviar, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. butyricum*) sau de *Nocardia*.

Utilizarea este însă limitată la animalele de laborator, datorită diferitelor efecte negative: 1) deoarece uleiul de parafină nu este biodegradabil, resorbția sa metabolică se realizează cu mare dificultate; 2) prezența asociată a celulelor bacteriene întregi determină febră, reacții inflamatorii locale, apariția de granuloame tisulare (mici tumorete dureroase), sensibilizarea organismului la tuberculină, dezvoltarea locală exagerată a sistemului limfoid, apariția de poliartrite alergice, sensibilizarea față de endotoxinele bacteriilor intestinale etc. (Lederer, 1963).

Adjuvantul Freund complet este considerat ca foarte util în practica de laborator, pentru a stimula un răspuns intens și prelungit, mediat umoral și celular față de antigene proteice. Este inactiv în asociere cu antigenele timoindependente de tipul polizaharidelor pneumococice sau al polivinil pirolidonei.

Mecanismul acţiunii sale este incomplet elucidat. După Webb Jr. şi Winkelstein (1984), prezenţa uleiului ar crea o barieră protectoare care întîrzie distrugerea locală şi eliminarea antigenului. Ea ar favoriza dispersia antigenului, eliminarea continuă de la locul de injecţie şi protejarea lui pînă la locul interacţiunii cu celulele sistemului imunitar. Se adaugă rolul stimulator al unor constituenţi ai celulelor bacteriene (mucopolizaharide, lipide, ARN etc.).

După date mai recente (Behbehari, Beller şi Unanue, 1985), adjuvantul Freund complet ar acţiona pe două căi majore : 1) stimulînd sinteza şi secreţia de IL-1 ; 2) stimulînd exprimarea moleculelor CMH din clasa II (Ia), pe suprafaţa celulelor care prezintă antigenul şi favorizînd pe această cale interacţiunea acestora cu limfocitele T_{H}.

Adjuvantul Freund incomplet (lipsit de celule bacteriene) este un înlocuitor slab al formei complete. El stimulează producerea de anticorpi şi numai o formă tranzitorie de reactivitate cutanată, caracterizată prin infiltrate cu bazofile.

Muramil-dipeptidul

Începînd din anul 1962, mai multe grupuri de cercetători au studiat proprietăţile biologice ale diferitelor fracţiuni chimice, izolate din pereţele bacteriei *Mycobacterium tuberculosis*, ca şi al unor specii atipice (*M. kansasii*) sau saprofite (*M. smegmatis*, *M. phlei* etc. (Lederer, White, Chedid). Scopul principal al acestor cercetări a fost de a înlocui celulele bacteriene întregi din adjuvantul Freund şi de a evita o bună parte din dezavantajele acestuia. Cu această ocazie s-a demonstrat că structura minimală care poate produce un efect similar celui dat de celulele bacteriene întregi (sau chiar mai bun) este un constituent al peptidoglicanului parietal, cu formula *N-acetil-muramil-L-alanil-D-izoglutamină*, numit *muramil-dipeptid* şi notat cu acronimul MDP.

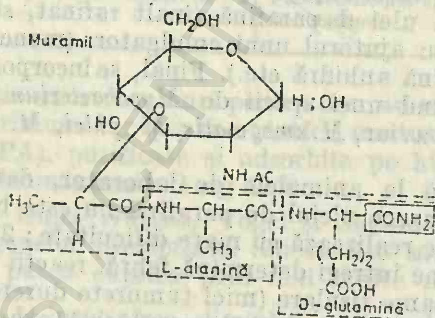


Fig. 316. — Structura chimică a mura- mil-dipeptidului.

Puterea adjuvantă depinde deopotrivă de configuraţia sterică a moleculei şi de constituenţii săi (fig. 316). Reducerea acidului muramic sau eliminarea componentei ciclice scad foarte mult activitatea, în timp ce înlocuirea D-Glu cu D-Asp, o anulează integral. Puterea imunostimulatoare a MDP este foarte mare, 10 μg MDP, înlocuind în adjuvantul Freund 50 μg de celule întregi de *Mycobacterium*.

El nu este antigenic, nu induce fenomene de hipersensibilitate și este atoxic. Mărește masiv titrul anticorpilor circulanți, nu produce efectele secundare caracteristice adjuvantului Freund complet, este activ în soluție apoasă și chiar după administrare pe cale orală.

MDP a fost sintetizat chimic de Merser și Sinay (1975). Deoarece în anumite condiții molecula originară produce febră (Kotan și colab., 1976) și are o serie de activități neurofarmacologice (este somnogen), Lefrancier (1982) a sintetizat peste 300 de derivați. Cel mai util s-a dovedit produsul Murabutide (ester butilic al MDP), care este studiat experimental (Chedid, 1985, 1987). Efectul imunostimulator al MDP sintetic este determinat de capacitatea lui de a induce sinteza și eliberarea unor cantități mari de interleukină-1 (Behbehari, Beller și Unanue, 1985).

Perspectivele obținerii de noi adjuvanți ai imunității

Posibilitatea obținerii de vaccinuri „subunitare", în special pe bază de spicule virale, a determinat necesitatea de a studia capacitatea protectoare a diferitelor forme fizice de substanțe imunogene și de a găsi noi forme de stimulare a activității lor.

După cum s-a demonstrat, glicoproteinele purificate (peplomerele de spicule), obținute prin solubilizare cu detergenți sau prin clivarea enzimatică a porțiunii lor hidrosolubile din învelișul viral, au un efect imunogen foarte slab. În unele cazuri, ele exercită chiar un efect imunosupresor, acționînd direct asupra celulelor T_S și inhibînd elaborarea unui răspuns eficient (Morein și Simons, 1985).

Micelele proteice (Agregatele micelare)

Spre deosebire de spiculele izolate, formele micelare ale proteinelor din învelișul extern viral sînt, în general, mai imunogene. Ele sînt forme multimere, agregate de spicule („Spike protein micelles"), a căror imunogenitate este comparabilă celei a virionilor întregi inactivați.

Modul lor de formare, care ilustrează, de altfel, un fenomen general a fost demonstrat în cazul virusului Semliki Forest (VSF). Virionii VSF au un genom ARN și o capsidă alcătuită din 180 de proteine. Învelișul extern conține 180 de spicule glicoproteice, fiecare fiind un trimer alcătuit din polipeptidele E1 (50 kdal), E2 (50 kdal) și E3 (10 kdal). Eliberate prin tratare cu Triton X-100 și după îndepărtarea urmelor de detergent și de lipide, spiculele se asociază spontan, pentru a forma agregate (micele proteice). În cazul VSF, ele au structură octameră $(E1, E2, E3)_8$ și o g.m. $9{,}5 \times 10^6$ dal. Cele mai multe agregate de spicule au aspectul de rozetă, rezultată din asocierea domeniilor hidrofobe ale proteinelor, pentru a forma o regiune centrală hidrofobă („Core"), de la care pornesc spre periferie domeniile hidrofile ale spiculelor.

În general, micelele au o putere imunogenă mult superioară față de spiculele izolate purificate. Astfel, 10 μg de micele protejează șoarecele față de 10 000 LD50 de virus Semliki Forest virulent. [Capacitatea imunogenă a agregatelor de spicule a fost demonstrată și în cazul virusurilor gripale, parainfluenza 3, rabic și hepatitei.

Virosomii (Imunosomii)

Virosomii sînt structuri artificiale echivalente veziculelor fosfolipidice (liposomi), în care au fost incluse glicoproteine de tipul spiculelor virale solubilizate, cu scopul de a mima configurația fizică a acestora în particula virală matură (Almeida și colab., 1981). Aceste structuri au fost descrise sub denumirea mai adecvată, dar mai puțin răspîndită, de *imunosomi* (Thibodeau și colab., 1981).

Pentru producerea lor se folosesc liposomi formați din substanțe neimunogene și biodegradabile (fosfatidil-colină, colesterol și lizolecitină), cărora li se adaugă spicule eliberate din învelișul extern viral, prin solubilizare cu Triton χ—100. Imunosomii reconstituie învelișul extern viral, asigurînd expunerea spiculelor pe suprafața veziculelor lipidice, după legarea lor în stratul dublu lipidic.

Experimental s-a demonstrat că imunogenitatea glicoproteinelor virale integrate în virosomi este mult mai mare decît cea a unei cantități egale de spicule purificate (Rouse, 1982). Imunogenitatea mărită s-ar datora, pe de o parte, modului de legare a spiculelor în liposomi, care mimează configurația naturală în virion, și, pe de alta, efectului adjuvant al lipidelor (Gregoriades și Manesis (1982).

Imunogenitatea virosomilor variază în funcție de : 1) mărimea liposomilor ; 2) compoziția lor chimică (componenții care măresc rigiditatea liposomilor ar avea un rol favorizant asupra imunogenității) ; 3) sarcina electrică ; 4) densitatea epitopilor pe suprafața lor.

Între avantajele virosomilor sînt de menționat : 1) posibilitatea utilizării lor ca un vaccin multivalent, prin încorporarea mai multor tipuri diferite de spicule virale ; 2) mărirea imunogenității, prin încorporarea unor adjuvanți, în structura lor (de exemplu, MDP).

Virosomii sînt, în general, greu de produs în condiții-standard, sînt relativ greu de conservat, deoarece au o fragilitate mare, și își pierd în timp imunogenitatea.

Complexele imunostimulatoare („Iscomii")

Morein și colab. (1984, 1987) au elaborat un procedeu de obținere a unor complexe imunostimulatoare prin legarea spiculelor virale de glicozidul Quil-A. Menit să evite dezavantajele virosomilor, acest procedeu a fost testat inițial cu spiculele izolate din virusul gripal, parainfluenza 3 și rujeolă. Complexele obținute au fost descrise sub acronimul *Iscom* („*I*mmunostimulating *com*plex").

Quil-A este un produs semipurificat de saponină, izolat din scoarța arborelui sud-american *Quillaja saponaria* (Molina). Componentul activ major, un triterpenoid acid, de care este legat un glucid, este o moleculă amfipatică, tensioactivă, capabilă să formeze spontan micele. La o concentrație critică de 0,03%, forma micelară are regiuni accesibile pentru interacțiuni hidrofobe cu alte molecule amfipatice (peptide, glicoproteine de membrană externă virală etc.) pentru a produce forme multimere definite.

Complexele imunostimulatoare apar la microscopul electronic sub forma unor construcții fizice bine definite ca o cușcă („Cage-like struc-

tures"), stabile, cu diametrul de 35,0 nm și constanta de sedimentare 19 S (fig. 317).

„Iscomii" produși prin legarea hemaglutininelor și a neuraminidazelor izolate din virusurile gripal, parainfluenza 3, rabie, precum și a hemaglutininelor și a proteinei de fuziune din virusul de rujeolă au fost testați în experiențe de vaccinare, pe animale de laborator (șoareci BALB/c).

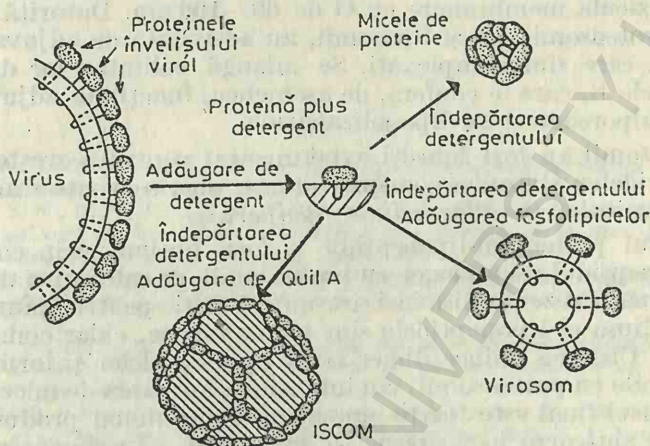


Fig. 317. — Reprezentare schematică a tehnicii de obținere a micelelor proteice, a virosomilor și a iscomilor din extractul cu detergent al unui virus (după Morein, 1987).

În general, imunogenitatea lor este de zece ori mai mare decît cea a virusului intact inactivat sau decît cea a micelelor care conțin spicule. „Iscomii" care conțin 0,5 µg proteină induc un răspuns imun egal cu cel produs de un vaccin micelar cu 5µ g de proteină. Imunizarea șoarecilor cu complexe imunostimulatoare, care conțin antigen de hepatită B (HBsAg) clonat pe levuri, stimulează atît imunitatea mediată umoral (cu producerea inițială de IgM și ulterior de IgG), cît și imunitatea mediată celular.

Complexele imunostimulatoare sînt folosite, în prezent, numai în imunizarea animalelor (în special în febra aftoasă), cu rezultate foarte bune. Ele au avantajul de a funcționa ca purtători imunostimulatori pentru molecule diferite, în forme multimere. Antigenele încorporate sînt foarte imunogene, datorită prezentării lor pe o particulă submicroscopică, într-o formă asemănătoare structurii fizice a particulei virale native. Întrucît adjuvantul este încorporat, cantitatea lui poate fi redusă de 100—1 000 de ori.

După datele actuale, Quil-A, în dozele folosite în practică, este netoxic. Astfel, doza toxică pentru șoarece este de 10—150 µg, în timp ce produsul imunogen conține numai 0,5 µg Quil-A. Nu au fost semnalate fenomene secundare la șobolan, cobai, iepure, taurine și maimuțe. Sînt în curs studii toxicologice la om (Morein și colab., 1988).

Proteosomii

Sub această denumire, Lowell și colab. (1988) au descris o serie de preparate purificate obținute din proteina membranei exterine de la meningococ ce pot fi folosite ca adjuvant, pentru a stimula imunogenitatea peptidelor sintetice.

Proteosomii sînt structuri membranare hidrofobe, multimoleculare, avînd tendința să formeze, datorită interacțiunilor hidrofobe proteină/proteină, vezicule membranare cu Ø de 60–100 nm. Datorită structurii lor fizice, proteosomii, ca și liposomii, au activitate de adjuvant pentru peptidele cu care sînt complexați. Se adaugă calitatea lor de mitogeni pentru celulele B, care le conferă, de asemenea, funcții de adjuvant chiar la șoarecii hiporeactivi la lipopolizaharide.

Proteosomii au fost folosiți experimental pentru a crește imunogenitatea peptidelor sintetice corespunzătoare unei secvențe din structura circumsporozoitului de *Plasmodium falciparum*.

Vaccinul proteosom-lipopeptidic a fost obținut prin complexarea hidrofobă a peptidului imunogen cu proteosomii, pe calea unei molecule de lauroil-cisteină. Prezența cisteinei are un rol critic pentru imunogenitate, deoarece în lipsa ei lipopeptidele sînt neimunogene, chiar complexate cu proteosomii. Cisteina induce dimerizarea lipopeptidelor și formează legături mai stabile cu proteosomii sau intensifică formarea de micele lipopeptidice. Produsul final este foarte imunogen, determinînd producerea unui titru înalt de anticorpi la șoarece. În prezent se experimentează pe un lot de 20 000 de persoane un vaccin meningococic ce conține proteosomi.

Proteosomii nu produc efecte negative pentru orgnismul uman și pot servi concomitent ca adjuvanți și ca purtători pentru diferite peptide sintetice în producerea unor vaccinuri multivalente („cocktail vaccins"). Ei reprezintă, după Lowell și colab. (1988), un sistem larg aplicabil ca vehicul menit să stimuleze imunogenitatea vaccinurilor peptidice, în general, și a celui anti-malaric în special.

Bibliografie selectivă

ABELL, C. W., DENNEY, M. R., 1985, *Application of monoclonal antibodies in basic research, diagnosis and therapy.* J. Nat. Products, **48** : 193–202.

ABRAHAM, S. N., BEACHEY, E. H., 1985, *Host defenses against adhesion of bacteria to mucosal surfaces.* În : *Advances in Host defense Mechanisms* (Gallin, J. I., Fauci A.S. eds.). Raven Press, New York, p.63 –88.

ABSOLOM, D. R., van OSS, C. J., 1986, *The nature of the antigen-antibody bond and the factors affecting its association and dissociation.* C. R. C. Critical Rev. Immunol., **6** : 1–46.

ADA, G. L., PARISH, C. R., 1968, *Low zone tolerance to bacterial flagellin in adult rats: a possible role for antigen localized in lymhoid follicles.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **61** : 556–561.

ADAM G., 1980, *Theoretical models of lymphocyte network interactions in ontogenic generation of antibody diversity.* În : *Theoretical Immunology* (Bell, G. I., Perelson, A. S., Pimbley, G. H., eds.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 603–627.

ADAMS, D. O., HAMILTON, T. A., 1984, *The cell biology of macrophage activation.* Ann. Rev. Immunol., **2** : 283–318.

ADORINI, L., 1980, *Basic strategies of the immune system in the regulation of antibody response.* La ricerca in clinica e in laboratorio, **10** : 313–330.

ALLAVENA, P., ORTALDO, J. R., 1984, *Characteristics of human NK clones : target specificity and phenotype.* J. Immunol., **132** : 2363–2369.

ALLISON, A. C., 1987, *An overview of host defense mechanisms.* În : *Immunopharmacology of infectious diseases. Progress in leucocyte biology,* **6** : 17–27.

ALT, F. W., BLACKWELL, T. K., YANCOPOULOS, G. D., 1987,. *Development of the primary antibody repertoire.* Science (S.U.A.), **238** : 1079–1087.

AMIT, A. G., MARIUZZA, R. A., PHILLIPS, S.E.V., POLJAK, R. J., 1986, *Three-dimensional structure of an antigen — antibody complex at* 2,8Å *resolution.* Science, **233** : 747–753.

ANDERSSON, U., BIRD, A. G., BRITTON, S., PALACIOS, R., 1981, *Humoral and cellular immunity in humans, studied at the cell level from birth to two years age.* Immunol. Rev., **57** : 5–38.

ARNON, R., SHAPIRA, M., JACOB, C. O., 1983, *Synthetic vaccines.* J. Immunol. Methods, **61** : 261 – 273.

ARNON, R., SELA, M., 1985, *Synthetic vaccines : present and future.* Ann. Inst. Pasteur Immunol., **136** D : 271 – 282.

ASHMAN, R. F., 1984, *Lymphocyte activation* : În : *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 267–302.

ASTALDI, G., TOPUZ, O. U., NERI, A., IACOPINO, P., 1980, *Aspetti attuali della ontogenesi e della differenziazione dei linfociti.* Boll. Ist. Sieroter Milanese, **59** : 255–292.

ATWELL, J. L., MARCHALONIS, J. J., 1976, *Immunoglobulin classes of lower vertebrates distinct from IgM immunoglobulin.* În : *Comparative Immunology,* (Marchalonis, J. J., ed.) Blackwell Sci. Publ., Oxford, p. 276–297.

AULT, A. K., UNANUE, E. R., 1980, *Lymphocyte surface immunoglobulin : its disposition on the membrane and its role in B-lymphocyte physiology.* În : *Theoretical Immunology* (Bell, G. I., Perelson, A. S., Pimbley, G. H., eds.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 145–169.

AZUMA, C., TANABE, T., KONISHI, M., KINASHI, T., NOMA, T., MATSUDA, F., YAOITA, Y., TAKATSU, K., HAMMARSTROM, L., SMITH, C. I. E., SEVERINSON, E., HONJO, T., 1986, *Cloning of cDNA for human T-cell replacing factor (interleukin-5) and comparison with the murine homologue*. Nucleic Acids Research, **14**: 9149–9158.

BACH, F. J., GOOD, R. A. (eds.), 1972, *Clinical Immunology*, I, II, Academic Press, New York & Londra.

BACH, F. J. (ed.), 1976, *Immunologie*, Flammarion, Medicine – Science, Paris.

BAGGIOLINI, M., 1972, *The enzymes of the granules of polymorphonuclear leukocytes and their functions*, Enzymes, **13**: 132–160.

BAGGIOLINI, M., 1980, *The neutrophil*, În: *Handbook of inflammation* (Weissmann, I. ed.), vol. 2. „The cell biology of inflammation", Elsevier, North Holland Amsterdam, p. 163–181.

BAGGIOLINI, M., DEWALD, B., 1985, *The Neutrophil*, Int. Arch. Allergy appl. Immun., **76**, suppl. 1: 13–20.

BAINTON, D. F., 1980, *The cells of inflammation: a general view*. În: *Handbook of inflammation* (Weissmann I., ed.), vol. 2, The cell biology of inflammation", Elsevier, North Holland Amsterdam, p. 1–25.

BALTIMORE, D., 1981, *Somatic mutation gains its place among the generators of diversity*, Cell, **26**: 295–296.

BARRETT, J. T., 1974, *Textbook of immunology. An introduction to immunobiology*, ed. a 2-a, C. V. Mosby Co., Saint Louis, SUA.

BELL, G. I., 1980, *Lymphocyte traffic pattern and cell-cell interactions*. În: *Theoretical Immunology* (Bell, G. I., Perelson, A. S., Pimbley, G. H. eds.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 341–375.

BELL, G. I., PERELSON, A. S., 1980, *An historical introduction to theoretical immunology*. În: *Theoretical immunology* (Bell, G. I., Perelson, A. S., Pimbley, G. H., eds.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 3–41.

BENACERRAF. B., 1981, *Role of MHC gene products in immune regulation*. Science (S.U.A.), **212**: 1229–1238.

BERCEANU, ȘT., PĂUNESCU, E., 1981, *Biologia și patologia sistemului imun*. Editura Academiei, București.

BERNARDS, A., 1984, *Antigenic variation of trypanosomes*. Bioch. & Biopys. Acta, Elsevier, Science, Publ. B. V., p. 1–15.

BERRIDGE, M. J., 1985, *The molecular basis of communication within the cell*. Sci. Amer., **253**: 142–152.

BERZOFSKY, J. A., SCHECHTER, A. N., 1981, *The Concepts of crossreactivity and specificity in immunology*. Mol. Immunol., **18**: 751 – 763.

BERZOFSKY, J. A., BERKOVER, I. J., 1984, *Antigen – antibody reactions*. În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 595–644.

BIENNENSTOCK, J., BETFUS, A. D., 1980, *Mucosal immunology*. Immunology, **41**: 249–270.

BINAGHI, R. A., 1973, *Les anticorps anaphylactiques des mammifères. I. Structure et propriété physicochimiques*. Bull. Inst. Pasteur, **71**: 249–279.

BIER, O. G., GOTZE, D., MOTTA, I., DIAS da SILVA, W. D., 1979, *Experimentelle und Klinische Immunologie*, Springer-Verlag, Berlin.

BIER, O. G., DIAS da SILVA, W. D., GOTZE, D., MOTA, I., 1986, *Fundamentals of Immunology*. Springer-Verlag, New York.

BLOOM, B. R., 1979, *Games parasites play: how parasites evade immune surveillance*. Nature (Londra), **279**: 21–22.

BOARD, R. G., FULLER, R., 1974, *Non specific antimicrobial defences of the avian egg, embryo and neonate*. Biol. Rev., **49**: 15–49.

BOCCI, V., 1985, *Immunomodulators as local hormones: new insights regarding their clinical utilization*. J. Biol. Response Modif., **4**: 240–352.

BOCCI, V., 1985, *The physiological interferon response*, Immunol. Today, **6**: 7–9.

BOCKMANN, D. E., BOYDSTON, W. R., BEEZHOLD, D. H., 1983, *The role of epithelia cells in gut-associated immune reactivity*. Ann. N. Y. Acad. Sci., **409**: 129–143.

BOLHUIS, R. L. H., GRAVEKAMP, C., VAN DE GRIEND, R. J., 1986, *Cell-cell interactions*, Clin. Immunol. and Allergy, **6**: 29–90.

BONA, A. C., PERNIS, B., 1984, *Idiotypic networks*. În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 577–594.

BONA, Co, MORAN, T., 1985, *Idiotypic vaccines*. Ann. Inst. Pasteur. Immunol., 136c: 289–312.
BONA, C. A., KANG, C. Y., KÖHLER, H., MONESTIER, M., 1986, *Epibody: the image of the network created by a single antibody*. Immunol. Rev., 90: 115–127.
BOUSQUET, J., MICHEL, F. B., 1978, *Les immunoolglobulines intervenant dans la defense de l'appareil respiratoire*. Rev. fr. malad. Resp., 6: 629–659.
BORYSIEWICZ, L. E., SISSOWS, J. G. P., 1986, *Immune response to virus infected cells*. Clin. Immunol. and Allergy, 6: 159–188.
BOUT, D. T., DAVID, J. R., *L'activation des macrophages par les médiateurs lymphocytaires*. Path. Biol., 28: 260–270.
BOYD, J. E., JAMES, K., Mc CLELLAND, D. B. L., 1984, *Human monoclonal antibodies — production and potential*. Trends Biotechnol., 2: 70–77.
BOYDEN, S. V., 1966, *Natural antibodies and the immune response*. Adv. Immunol., 5: 1–28.
BRAND, G., 1974, *Die Bedeutung der Spezifität von Immunoreaktionen*. Zbl. Bakt. Hyg., I, Abt. Orig. A 227: 167–183.
BRANDTZAEG P., 1983, *The secretory immune system of lactating human mammary glands, compared with other exocrine organs*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 409: 353–381.
BRANDTZAEG, P., 1985, *The human secretory Immune system. General review*. In: *Mucosal Immunity IgA and polymorphonuclear neutrophils* (Revillard J. P., Voisin, C., Wierzbbicke M., eds.), Fond Franco-Allemande, Suresnes, p. 11–44.
BRETSCHER, M. S., 1984, *Endocytosis: relation to capping and cell locomotion*. Science (S.U.A.), 224: 681–686.
BRITTEN, V., HUGHES, H. P. A., 1986, *Clinics in immunology and allergy. Immunological recognition of altered cell surfaces in infection and disease*. W. B. Saunders Co., Londra.
BRODSKY, F. M., 1988, *Monoclonal antibodies as magic bullets*, Pharmac. Res., 5: 1–9.
BRONI, C., GIOVENCO, M. A., KOCH, G., STROM, R., 1980, *Modeling of immune response: a system approach*. În: *Theoretical immunology* (Bell, G. I., Perelson, A. S., Pimbley, G. H., eds.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 379–414.
BROSTOFF, J., CHALLACOMBE, S. J. (eds.), 1987, *Food Allergy and Intolerance*, Baillière Tindall, Londra.
BROWN, E. J., JOINER, K. A., FRANK, M. M., 1984, *Complement*. În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 645–668.
BROWN, M. R. W., WILLIAMS, P., 1985, *The influence of environment on envelope properties affecting survival of bacteria in infections*. Ann. Rev. Microbiol., 39: 527–556.
BURDETTE, S., SCHWARTZ, R. S., 1987, *Idiotypes and idiotypic networks*. The New Engl. J. Med., 317: 219–224.
BURNET, M. F., 1957, *A modification of Jerne's theory of antibody production, using the concept of clonal selection*. Austr. J. Sci., 20: 67–68.
BURNET, M. F., 1964, *The darwinian approach to immunity*. În: *Molecular and cellular basis of antibody formation*, Praga, p. 17–20.
BURNET, M. F., 1966, *The integrity of the body*. Harward Univ. Press
BURNET, M. F., 1972, *Immmunology as scholarly discipline*. Persp. Biol. and Med., 16: 1–10.
BURNET. M. F., 1980, *Clonal selection and after*. În: *Theoretical Immunology* (Bell, G. I., Perelson, A. S., Pimbley, G. H., eds.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 63–85.
BUSSARD, A. E., 1972, *Influence de l'immunologie sur la pensée biologique moderne*. Bull. Inst. Pasteur, 70: 307–338.
BUTCHER, E. C., WEISSMAN, I. L., 1984, *Lymphoid tissues and organs*. În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 109–130.
CABILLY, S., RIGGS, A. D., PANDE, H., SHIVELY, J. E., HOLMES, W. E., REY, M., PERRY, L. J., WETZEL, R., HEYNEKER, H. L., 1984, *Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3273–3277
CAMERON, J., 1986, *The changing face of vaccine production*. Ann. Immunol. hung., 26: 97–114.
CAMPBELL, P. A., 1976, *Immunocompetent cells in resistance to bacterial infections*. Bacteriol. Rev., 40: 284–313.
CAMPBELL, P. N., PHELPS, C. F., (eds.), 1984, *Molecular Variants of proteins: biosynthesis and clinical relevance*, The biochemical Society, Londra.
CANTOR, H., 1984, *T lymphocytes*. În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 57–70.

CANTOR, H., CHESS, L., SERCARZ, E., 1984, *Regulation of the immune system*. UCLA Symposia on molecular and cellular biology, vol. 18, Alan R. Liss Inc., New York.

CANTRELL, D. A., SMITH, K. A., 1983, *Transient expression of interleukin-2 receptors : consequences for T cell growth*. J. Exp. Med., **158** : 1895—1911.

CANTRELL, D. A., SMITH, K. A., 1984 *The interleukin-2 system : a new cell growth model*. Science (S.U.A.), **224** : 1312—1316.

CAPRA, J. D., EDMUNDSON, A. B., 1977, *The Antibody Combining site*. Sci. Amer., **236** : 50—59.

CAPRON, A., DESSAINT, J. P., 1977, *IgE and cells in protective immunity*. Path. Biol., **25** : 287—290.

CAPRON, A., DESSAINT, J. P., 1977, *IgE et immunité*. Rev. franc. allergol., **17** : 75—78.

CARPEN, O., VIRTANEN, I., SAKSELA, E., 1982, *Ultrastructure of human natural killer cells : nature of the cytolytic contacts in relation to cellular secretion*, J. Immunol., **128** : 2691—2697.

CARTER, M. J., Ter MEULEN, V. V., 1984, *The application of monoclonal antibodies in study of viruses*. Adv. Virus Res., **29** : 95—130.

CEROTTINI, J. C., 1980, *Clonal analysis of cytolytic T lymphocytes and their precursors*. În : *Progress in Immunology, IV* (Fougereau, M., Dausset, J., eds.), Academic Press, New York, p. 622—632.

CHEDID, L., 1985, *Adjuvants of immunity*. Ann. Inst. Pasteur, Immunol., **136 D** : 283—291.

CHEDID, L., HADDEN, J. W., SPREAFICO, F., DUKOR, P., WILLOUGHBY, I, 1986, *Advances in immunopharmacology*. Pergamon Press, Oxford.

CHESTNUT, R. W., GREY, H M., 1981, *Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells*. J. Immunol., **126** : 1075—1079.

CLARK, S. C., KAMEN, R., 1987, *The human hematopoietic colony-stimulating factors*. Science (S.U.A.), **236** : 1229—1237.

CLERICI, E., VILLA, M. L., 1978, *Immunologia generale*, ed. a 4-a, Unione tipografico-Editrice torinese.

CLINE, M. J., 1970, *Leukocyte function in inflammation : the ingestion, killing and digestion of microorganisms*. Ser. Hemat., **III** : 3—16.

COHEN, N., 1976, *Immunologic diversity within the class Amphibia*. În : *Comparative Immunology*, (Marchalonis J. J., ed.), Blackwell Sci. Publ., Oxford, p. 209—206.

COHN, Z. A., 1978, *The activation of mononuclear phagocytes : facts, fancy future*. J. Immunol., **121** : 813—816.

COHN, M., LANGMAN, R., 1982, *The T cell receptor : multitudes in the valley of decisions*. Behring Inst. Res. Commun., **70** : 219—241.

COHN, M., 1985, *Diversity in the immune system : „Preconceived ideas" or ideas preconceived*. Biochimie, **67** : 9—27.

COLTEN, H. R., 1985, *Complement biosynthesis*. Clin. Immun. & Allergy, **5** : 287—301.

COLTEN, H. R., DOWTON, S. B., 1986, *Regulation of complement gene expression*. În : *Genes and proteins in immunity* (Kay, J., Kerr, M. A., Williams, A. F., Reid, K. B. M., eds.), The Biochemical Society, Londra, p. 37—47.

CONE, R. E., 1981, *Molecular basis for T lymphocyte recognition of antigens*. Progr. Allergy, **29** : 182—221.

CONGDON, C. C., 1969, *Lymphatic tissue germinal centers in immune reactions* (Butler, J. A. V., Noble, D., eds.) În : Progr. Biophys. Molec. Biol., Pergamon Press, Oxford & New York.

COOPER, M. D., LAWTON III, A. R., 1974, *The development of the immune system*. Sci. Amer., **231** : 59—72.

COOPER, E.L., 1982, *General Imunology*. Pergamon Press, Oxford.

COOPER, M. D., KEARNEY, J., SCHER, I., 1984, *B lymphocytes*. În : *Fundamental Immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 43—56.

COOPER, M. D., 1986, *B cell development in birds and mammals*. În : Progress in Immunology (Fougereau, M., Dausset J., eds.) vol. VI : 18—32, Acad. Press Inc., New York.

CORBITT, G., STOREY, C. C., 1983, *Monoclonal antibody—current techniques and applications*. Biochem. Educ., **11** : 125—130.

COWDEN, R. R., DYER, R. F., 1971, *Lymhopoietic tissue and plasma cells in amphibians*. Amer. Zoologist., **11** : 183—192.

CRUSE, J. M., LEWSI, Jr. R. E., 1987, *Regùlation of immune reactivity to self*. Concepts in Immunopathology, Karger, Basel, **4** : 1—23.

CRUSE, J. M., LEWIS, Jr. R. E., 1988, *The metamorphosis of immunological science.* In: *The year in immunology*, Karger, Basel, 3: 1–31.
CUNNINGHAM, A. J., 1975, *Self-tolerance maintained by active suppressor mechanism.* Transpl. Rev., 31: 23–43.
CUNNINGHAM, B. A., 1977, *The structure and function of histocompatibility antigens*, Sci. Amer., 237: 96–106.
CUNNINGHAM, A. J., 1980, *Gestalt Immunology: a less reductionist approach to the subject.* În: *Theoretical immunology* (Bell, G. I., Perelson, A. S., Pimbley, G. H., eds.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 45–61.
DALES, R. P., 1979, *Defence of invertebrates against bacterial infection.* J. Roy. Soc. Med., 72: 688–696.
DANIELS, J., RITZMANN, S. E., LEVIN, W. C., 1968, *Lymphocytes: morphological, developmental and functional characteristics in health, disease and experimental study. An analytical review.* Rep. Biol. Med., 26: 5–92.
DAVIES, J. E., 1985, *Genetic engineering and vaccines.* Ann. Inst. Pasteur, Immunol., 136 D: 143–150.
DAVIS, M. M., LINDSTEIN, T., GASCOINE, N. R. J., GOODNOW, C., CHIEN, Y – H., 1986, *Paradigme regained: Similarities and differences between T cell receptor and immunoglobulin genes.* În: *Genes and proteins in immunity* (Kay J., Kerr M. A., Williams A. F. și Reid K. B. M., eds.), The biochemical Society, Londra, p. 205–211.
De FRANCO, A. L., 1987, *Molecular aspects of B-lymphocyte activation*, Ann. Rev. Cell Biol., 3: 143–178.
DEGOS, L., 1979, *Rôle du système HLA en biologie et en pathologie.* La nouvelle Presse Medicale, 8: 3109–3111.
De LISI, C., 1980, *Some physical-chemical aspects of cellular selection in an immune reaction.* În: *Theoretical Immunology* (Bell, G. I., Perelson, A. S., Pimbley, G. H., eds.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 215–242.
DE MAEYER, E., FAUVE, R. M., DE MAEYER–GUIGNARD, J., 1971, *Production d'interferon au niveau du macrophage.* Ann. Inst. Pasteur, 120: 438–446.
DESSAINT, J. P., CAPRON, A., 1980, *Interactions cellulaires de l'IgE. Vers une nouvelle fonction de l'IgE.* Path. Biol., 28: 605–616.
DEVERALL, B. J., 1972, *Phytoalexins and disease resistance.* Proc. Roy. Soc., Londra, B, 181: 233–246.
DIEBOLD, J., 1986, *Le système des phagocytes mononuclées. Morphologie et fonctions des principales cellules le constituant.* Ann. Pathol., 6: 3–12.
DINARELLO, C. A., 1984, *Interleukin-1.* Rev. Inf. Dis., 6: 51–95.
DINARELLO, C. A., 1984, *Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response.* New Engl. J. Med., 311: 1413–1418.
DINARELLO, C. A., MIER, J. W., 1987, *Lymphokines.* New Journ. Engl. Med., 317: 940–945.
DINARELLO, C. A., 1988, *Biology of interleukin-1*, FASEB J., 2: 108–116.
DINTZIS, H. M., DINTZIS, R. Z., VOGELSTEIN, B., 1976, *Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 73: 3671–3675.
DOHERTY, P. C., 1980, *Surveillance of self: cell-mediated immunity to virally modified cell surface defined operationally by the major histocompatibility complex.* În: *Progress in immunology*, IV, vol. 2 (Fougerau, M., Dausset, J., eds.), Academic Press, New York, p. 563–577.
DONELSON, J. E., RICE-FICHT, A. C., 1985. *Molecular biology of Trypanosome antigenic variation.* Microbiol. Rev., 49: 107–125.
DONELSON, J. E., TURNER, M. J., 1985, *How the Trypanosome changes its coat.* Sci. Amer., 252: 44–51.
DORRINGTON, K. J., TANFORD, C., 1970, *Molecular Size and conformation of Immunoglobulins.* Adv. Immunol., 12: 333–381.
DREYER, W. J., BENNETT, J. C., 1965, *The molecular basis of antibody formation: a paradox.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 54: 864–869.
DUCA E., DUCA M., FURTUNESCU G., 1979, *Microbiologie medicală*, ed. a II-a, Edit. didactică și pedagogică, București.
DUCKWORTH, M., JACKSON, D., ZAK, K., HECKELS, J. E., 1983, *Structural variation in pili expressed during gonococcal infections.* J. Gen. Microbiol., 129: 1593–1596.

Du PASQUIER, L., HAIMOVICH, J., 1976, *The antibody response during amphibian ontogeny.* Immunogenetics, **3**: 381–391.

DUTTON, R. W., SWAIN, S. L., 1980, *Genetic restrictions on cell interactions in the immune response.* În: *Theoretical Immunology* (Bell G. I., Perelson, A. S., Pimbley, G. H., eds.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 303 – 340.

DZIEWANOSKA, Z. E., PESTKA, S., 1982, *The human interferons.* Med. Res. Rev., **2**: 325–353.

EISEN, H. N., 1974, *Immunology. An introduction to molecular and cellular principles of the immune response.* Harper & Row Publ., Hagerstown, Maryland.

EVANS, J. (ed.), 1978, *Immunology.* The Open Univ. Press. Biling & Sons Ltd., Greilford.

FARRAR, W. L., JOHNSON, H. M., FARRAR, J. L., 1981, *Regulation of the production of immune interferon and cytotoxic T lymphocytes by interleukin-2.* J. Immunol., **126**: 1120–1125.

FAUCI, A. S., 1984, *Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical, immunologic and therapeutic considerations.* Ann. Int. Med., **100**: 92–106.

FAUVE, R. M., 1980, *Inflammation and natural immunity.* În: *Immunology'80. Progress in Immunology, IV.* Academic Press, New York, p. 737–756.

FAZEKAS DE ST. GROTH, S., SCHEIDEGGER, D., 1980, *Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics,* J. Immunol. Methods, **35**: 1–21.

FINBERG, R. W., ERTL, H., 1987, *The use of antiidiotypic antibodies as vaccines against infections agents.* CRC Crit. Rev. Immunology, **7**: 269–284.

FITCH, F. W., 1986, *T-cell clones and T-cell receptors.* Microbiol. Rev., **50**: 50–69.

FLEISCHMAN, J. B., DAVIE, J. M., 1984, *Immunoglobulins: allotypes and idiotypes.* În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 205–220.

FOREHAND, J. R., JOHNSTON, R. B., 1985, *Phagocytic defects.* Clinics in Immunol. and Allergy, **5**: 351–371.

GARRISON-FATHMAN, C., FITCH, F. W., 1984, *Long-term culture of immunocompetent cells.* În: *Fundamental Immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 781–796.

GERSHON, R. K., KONDO, K., 1970, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes.* Immunol., **18**: 723–737.

GERSHON, R. K., 1974, *T-cell control of antibody production.* Contemp. Top. Immunol., **3**: 1–40.

GIFFORD, G. E., TOBEY, M., 1977, *Effect of interferon and lymphokynes on lymphocytes.* Texas Rep. Biol. Med., **35**: 375–380.

GIGLI, I., 1986, *Introduction to contemporary complement research.* În: *Genes and proteins in immunity* (Kay, J., Kerr, M. A., Williams, A. F., Reid, K. B. M., eds.), The Biochemical Society, Londra, p. 1–7.

GIURGEA, R., 1982, *Bursa lui Fabricius,* Editura Academiei, București.

GOLDSTINE, S. N., MANICKAVEL, V., COHEN, N., 1975, *Phylogeny of gut-associated lymphoid tissue.* Amer. Zool., **15**: 107–118.

GOOD, R. A., 1977, *Biology of the cell-mediated immune response – a review. I: Malnutrition and the Immune response* (Suskind, R. M. ed.), Raven Press, New York, p. 29–46.

GORDON, B. L., 1976, *Essential of immunology,* ed. a 2-a, Davis F. A., Co., Philadelphia.

GORDON, J., MINKS, M. A., 1981, *The interferon renaissance: molecular aspects of induction and action,* Microbiol. Rev., **45**: 244–266.

GOREN, M. B., 1977, *Phagocyte lysosomes: interactions with infectious agents, phagosomes and experimental perturbations in function,* Ann. Rev. Microbiol., **31**: 507–533.

GRAS, J., 1975, *Autoanticuerpos en normales.* Allergol. Immunopathol., **3**: 255–259.

GRAS, J., BOLOS, C., GARCIA, P., 1981, *Conditions of antigenic stimulation necessary for the termination of the IgM response and the appearance of a single and persistent IgG response: The change from IgM to IgG is a biological expansion of the response.* Allergol. et Immunopathol., **9**: 340–350.

GRAS, J., 1986, *El „mito" de la differenciatión inmunológica entre lo „proprio" y lo „no proprio" y la existencia de un „equilibrio immunológico u homeostasis inmunológica antigeno-dependiente.* Immunologia, **5**: 42–51.

GREAVES, M. F., OREA, J. J. T., COLAFF, M., 1974, *T and B lymphocytes. Origins, properties and rolein immune response.* Excerpta Medica, Elsevier Publ. Co. Inc., Amsterdam.

GREENE, M. I., SCHATTEN, S., BROMBERG, J. S., 1984, *Delayed hypersensibility.* În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 685–696.

GREGORY, R. L., 1986, *Microbial ribosomal vaccines.* Rev. Inf. Dis., **8**: 208–217.

GRESSER, I., 1975, *Interferon therapy : obvious and not so obvious applications*. Acta Med. Scandinav., 197 : 49—53.
GROSSMAN, C. J., 1985, *Interactions between the gonadal steroids and the immune system*, Science (S.U.A.), 227 : 257—261.
GUILLET, J. G., MING-ZONG, LAI, BRINGER, T. J., BUUS, S., SETTE, A., GREY, H. M., SMITH, J. A., GEFTER, M. L., 1987, *Immunological self-nonself discrimi-* Sciencenation, (S.U.A.), 235 : 865—870.
GUPTA, S., GOOD, R. A., 1982, *Qu'est-ce que la régulation immunitaire?* Triangle Journal Sandoz des Sciences Médicales, 22 : 1—5.
HAENEY, M., 1985, *Introduction to clinical immunology*, Butterworth Update Publ., Londra.
HAHN, H., 1974, *Zelluläre antibakterielle Immunität*, Zbl. Bakt. Hyg., I, Abt. Orig., A, 227 : 184—195.
HALLER, O., 1981, *Natural resistance to tumors and viruses*. Springer-Verlag, New York.
HANSON, L. A., AHLSTEDT, S., ANDERSON, B., CARLSSON, B., 1983, *Mucosal immunity*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 409 : 1—21.
HANSON, L. A., WIGZELL, H., 1985, *Immunology*, ed.a 6-a, Butterworths, Londra.
HAUROWITZ, F., 1965, *Antibody formation and the coding problem*, Nature (Londra), 205 : 847—851.
HAYWARD, A. R., 1981, *Development of lymphocyte response and interactions in the human fetus and newborn*. Immunol. Rev., 57 : 39—60.
HEBER-KATZ, H., HANSBURG, D., SCHWARTZ, R. H., 1983, *The Ia molecule of the antigen-presenting cell plays a critical role in immune response gene regulation of T cell activation*, J. Molec. Cell Immunol., 1 : 3—14.
HENNEY, C. S., GILLIS, S., 1984, *Cell-mediated cytotoxicity*. În : *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 669—684.
HERBERMAN, R. B., TIMONEN, T., ORTALDO, J. R., BONNARD, G. D., GORELIK, E., 1980, *Natural cell-mediated cytotoxicity*. În : *Progress in Immunology, IV* (Fougerau, M., Dausset, J., eds.), Academic Press, New York, p. 691—709.
HERBERMAN, R. B., ORTALDO, J., R., 1981, *Natural killer cells : their role in defenses against human diseases*. Science, 214 : 24—30.
HERBERMAN, R. B., HISERODT, J., VUJANOVIC, N., BALCH, C., LOTZOVA, E., BOLHUIS, R., GOLUB, S., LANIER, L. L., PHILLIPS, J. H., RICCARDI, C., RITZ, J., SANTONI, A., SCHMIDT, R. E., UCHIDA, A., 1987, *Lymphokine-activated killer cell activity. Characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen*, Immunol. Today, 8 : 178—181.
HEYMER, B., 1985, *Causative agents, mediators and histomorphology of inflammation*, Path. Res. Pract., 180 : 143—150.
HICKS, J., STRATHERN, J., HERSKOWITZ, I., 1977, *The cassette model of mating type interconversion*. În : *DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes* (Bukhari, A., Shapiro, J., Adhya, J. eds.), Cold Spring Harbor, New York, p. 457—462.
HILDEMANN, W. H., 1974, *Genetics of immune responsiveness*. Ann. Rev. Genetics, 7 : 19—36.
HILLEMAN, M. R., 1988, *Perspectives in the quest for a vaccine against AIDS*. În : *Human Retroviruses, Cancer and AIDS : Approaches to prevention and therapy*. Allan Liss Inc., New York, p. 291—311.
HO, M., ARMSTRONG, J. A., BREINIG, M. C., 1975, *Interferon*. Ann. Rev. Microbiol., 29 : 131—161.
HOGARTH, P. M., McKENZIE, I. F. C., 1984, *Lymphocyte antigens*. În : *Fundamental Immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 457—480.
HØIBY, N., DÖRING, G., SCHIØTZ, P. O., 1986, *The role of immune complexes in the pathogenesis of bacterial infections*, Ann. Rev. Microbiol., 40 : 29—53.
HOLÁŇ, V., HRABA, T., HAŠEK, M., 1985, *Co-operations and interactions of cells in immune response : a review of phenomena and mechanisms*. EOS-Rivista di immunologia ed immunofarmacologia, 5 : 118—124.
HOOD, L. E., STEINMETZ, M., GOODENOW, R., 1982, *Genes of the major histocompatibility complex*. Cell, 28 : 685—687.
HOOD, L. E., WEISSMAN, I. L., WOOD, W. B., WILSON, J. H., 1984, *Immunology*, The Benjamin Cummings Publ. Co. Inc. Mento Park Califotnia.
HORTON, D. J., 1971, *Ontogeny of the immune system in amphibians*. Amer. zoologist, 11 : 219—228.
HORWITZ, M. A., 1982, *Phagocytosis of microorganisms*, Rev. Infect. Dis., 4 : 104—123.
HOUBA, V., BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R. F., 1976, *Eosinophils and the immune response*. Immunopathology VIIth International Symposium (Mischer, P. A., ed.), Schwabe & Co., Basel.

HOZUMI, N., TONEGAWA, S., 1976, *Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions.* Proc. Natl. Acad. S.U.A., 73: 3628–3632.

HUBER, R., 1986, *Structural basis for antigen – antibody recognition*, Science (S.U.A.), 233: 702–703.

HUGHES-JONES, N. C., 1963, *Nature of the reaction between antigen and antibody.* Brit. Med. Bull., 19: 171–177.

HUMPHREY, J. H., WHITE, R. G., 1970, *Immunology for students of medicine.* Blackwell, Oxford.

IONESCU-DOROHOI, I., ȚIȚEICA, M. (sub red.), 1986, *Practica diagnosticului imunochimic. Baze teoretice, metodologie, aplicații clinice*, Edit. Medicală, București.

INMAN, J. K., 1980, *The Antibody combining region: speculations on the hypothesis of general multispecificity.* În: *Theoretical Immunology* (Bell, G. I., Perelson, A. S., Pimbley, G. H., eds.), Marcel Drukker Inc., New York, p. 243–278.

JANEWAY, C. A. Jr., CONE R. E., OWEN, F. L., 1984, *T lymphocyte receptors.* În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 245–266.

JENKINSON, E. L., OVEN, J. T., 1986, *Thymic influences on T cell development.* În: Progress in Immunology (Fougereau M., Dausset J., eds.), vol. VI: 67–76, Acad. Press Inc. New York.

JERNE, N. K., 1955, *The natural selection theory of antibody formation*, Proc. Natl. Acad. Sci. S.U.A., 41: 849–857.

JERNE, N. K., 1960, *Immunological speculations*, Ann. Rev. Microbiol., 14: 341–352.

JERNE, N. K., 1971, *The somatic generation of immune recognition*, Europ. J. Immunol., 1: 1–9.

JERNE, N. K., 1973, *The immune system*, Sci. Amer., 229: 52–60.

JERNE, N. K., 1974, *Towards a network theory of the immune system*, Ann. Immunol., Inst. Pasteur, 125 C: 373–389.

JERNE, N. K., 1976, *The immune system: a network of lymphocyte interactions.* În: *The immuno-system 27 Colloquia – Mosbach* (Melchers F., Rajewsky, M., eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 259–266.

JERNE, N. K., 1977, *The common sense of immunology*, Cold Spring Harbor Symposium on Quant. Biology, XLI: 1–4.

JERNE, N. K., ROLLAND, J., CAZENAVE, P. A., 1982, *Recurrent idiotypes and internal images*, EMBO J., 1: 243–247.

JERNE, N. K., 1985, *The generative grammar of the immune system*, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 24: 810–816.

JERNE, N. K., 1985, *The generative grammar of the immune system*, Nobel Lecture, Science (S.U.A.), 229: 1057–1059.

JESKE, D. J., CAPRA, J. D., 1984, *Immunoglobulins: structure and function.* În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 131–166.

JOHN, S., OWEN, M. J., 1985, *The molecular biology of the antigen-specific T cell receptor*, Trends in genetics, 9: 261–264.

JONES, G. W., ISAACSON, R. E., 1983, *Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors*, C R C Crit. Rev. Microbiol., 10: 229–260.

JOHNSTON, R. B., Jr., 1988, *Monocytes and macrophages.* The New Engl. J. Med., 318: 747–752.

KAPPLER, J. W., MARRACK, P. C., 1976, *Helper T cells recognize antigen and macrophage surface components simultaneously.* Nature (Londra), 262: 797–799.

KAY, J., KERR, M. A., WILLIAMS, A. F., REID, K. B. M., 1985, *Genes and proteins in immunity*, The Biochemical Society, Londra.

KEARNEY, J. F., 1984, *Hybridomas and monoclonal antibodies.* În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 751–766.

KEHRL, J. H., ALVAREZMON, M., DELSING, G. A., FAUCI, A. S., 1987, *Lymphotoxin is an important T cell-derived growth factor for human B cells.* Science (S.U.A.), 238: 144–146.

KELLER, H. U., WILKINSON, P. C., ABERCROMBIE, M., BECKER, E. L., HIRSCH, J. G., MILLER, M. E., SCOTT-RAMSEY, W., ZIGMOND, S. H., 1977, *A proposal for the definition of terms related to locomotion of leucocytes and other cells.* Clin. exp. Immunol., 27: 377–380.

KENNEDY, R. C., 1985, *Idiotype networks in hepatitis B virus infections.* În: *Images of biological active structures in the immune system* (Koprowski, H., Melchers, F., eds.), Current Topics in Microbiology and Immunology, 119: 1–13, Springer-Verlag, Berlin.

KENNEDY, R. C., MELNICK, J. L., DREESMAN, G. R., 1986, *Anti-idiotypes and immunity*. Sci. Amer., 255: 48–56.
KIEBER-EMMONS, T., KÖHLER, H., 1986, *Towards a unified theory of immunoglobulin structure-function relations*. Immunology Rev., 90: 29–48.
KIEBER-EMMONS, T., McNAMARA-WARD, M., WARD, R. E., KOHLER, H., 1987, *Structural considerations in idiotype vaccine design*. Monogr. Allergy, 22: 126–133.
KILIAN, M., THOMSEN, B., PETERSON, T. E., BLEEG, H. S., 1983, *Occurence and nature of bacterial IgA proteases*. Ann. Acad. Sci., New York 409: 612–624.
KINCADE, P. W., MORRE, M. A. S., 1977, *Ontogenetic emergence of immunocytes*. In: *The lymphocyte structure and function* (Marchalonis, J. J., ed.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 115–147.
KINDT, T. J., ROBINSON, M. A., 1984, *Major histocompatibility complex antigens*. In: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 347–378.
KIRCHNER, H., 1986, *The interferon system as an integral part of the defense system against infections*, Antiviral. Res., 6: 1–17.
KISSMEYER-NIELSEN, M., 1982, *Le système HLA-vue d'ensemble*. Triangle Journal Sandoz des Sciences Médicales, 22: 7–18.
KLEBANOFF, S. J., 1975, *Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes*, Seminars in Hematology, XII: 117–141.
KLEBANOFF, S. J., 1980, *Cytocidal mechanisms of phagocytic cells*. In: *Immunology'80, Progress in Immunology, IV*, vol. 2, Academic Press, New York, p. 720–736.
KLEIN, J., 1979, *The Major histocompatibility complex of the mouse*. Science (S.U.A.), 203: 516–519.
KLEIN, E., 1983, *Killing often spoken as natural*. Immunol. Today, 4: 97–98.
KNOPF, P. M., 1973, *Pathways leading to expression of immunoglobulins*. Transplant. Rev., 14: 145–162.
KÖHLER, G., MILSTEIN, C., 1975, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature (Londra), 256: 495–497.
KOLB, H., 1977, *On the phylogenetic origin of the immune system. A hypothesis*. Develop. and Comparat. Immunol., 1: 193–206.
KOPROWSKI, H., MELCHERS, F. (eds.), 1985, *Images of biologically active structures in the immune system*. In: Current Topics in Microbiology and Immunology, 116: Springer-Verlag, Berlin.
KOURILSKY, P., CLAVERIE, J. M., 1986, *The peptidic self model: a hypothesis on the molecular nature of the immunological self*. Ann. Inst. Pasteur. Immunol., 137 D: 3–21.
KUNKEL, H. G., MANNIK, M., WILLIAMS, R. C., 1963, *Individual antigenic specificity of isolated antibody*, Science (S.U.A), 140: 1218–1219.
LAGRANGE, P. H., 1985, *L'avenir des vaccinations: vaccins de l'avenir*. Ann. Inst. Pasteur Immunol., 136 D: 313–334.
LAJTHA, L. G., 1979, *Haematopoietic stem cells: concepts and definitions*. Blood Cells, 5: 447–450.
LAJTHA, L. G., 1979, *Stem cell concepts*. Differentiation, 14: 23–34.
LANGER, W. L., 1976, *Immunization against smallpox before Jenner*. Sci. Amer., 234: 112–117.
LANGER, J. A., PESTKA, S., 1985, *Structure of interferons*. Pharmac. Therap., 27: 371–401.
LANGONE, J. J., 1982, *Protein A from Staphylococcus aureus and related immunoglobulins receptors produced by streptococci and pneumococci*. Adv. Immunol., 32: 157–272.
LAURENCE, J., 1985, *The immune system in AIDS*. Sci. Amer., 253: 70–79.
LAURENCE, J., 1985, *Acquired Immune deficiency syndrome: aetiopathological considerations*. In: *Clinics in Immunology and allergy. Immunological intervention in Medicine, II* (Mowbray, J. F., ed.), W. B. Saunders Co., Londra, p. 159–186.
LEDER, P., 1982, *The genetics of antibody diversity*. Sci. Amer., 246: 72–83.
Le DOUARIN, N. M., 1977, *Ontogeny of primary lymphoid organs*. In: *B and T cells in immune recognition* (Loor, F., Roelants, G. E., eds.), J. Wiley & Sons, Londra, p. 1–19.
LERNER, R. A., TRAMONTANO, A., 1987, *Antibodies as enzymes*. TIBS, 12: 427–430.
LINDENMANN, J., 1984, *Origin of the terms „Antibody" and „Antigen"*. Scand. J. Immunol., 19: 281–285.
LIEW, Y., 1985, *New aspects of vaccine development*. Clin. Exp. Immunol., 62: 225–241.
LITTMAN, B. H., 1981, *Considerations immunologiques sur les maladies du tissu conjonctif*. Triangle Journal Sandoz des Sciences Médicales, 21: 7–15.

LOOR, F., ROELANTS, G. E. (eds.), 1977, *B and T cells in immune recognition*. J. Wiley & Sons, Londra.

LOPES, J. D., DOS, REIS, M., BRENTANI, R. R., 1985, *Presence of laminin receptors in Staphylococcus aureus*. Science (S.U.A.), **229**: 275—277.

LOOS, M. (ed.), 1985, *Bacteria and complement*. Current Topics in Microbiology and immunology, 121 Springer-Verlag, New York.

LU, C. Y., UNANUE, E. R., 1982, *Ontogeny of murine macrophages: functions related to antigen presentation*. Infection and Immunity, **26**: 327—329.

LU, C. Y., 1985, *Macrophage ontogeny. Implications for host defence, T lymphocyte differentiation and the acquisition of self-tolerance*. Clin. Immunol. and Allergy, **5**: 253—271.

LU, C. Y., UNANUE, E. R., 1985, *Macrophage Ontogeny: implications for host defence, T-lymphocyte differentiation and the acquisition of self-tolerance*. Clin. Immunol. an Allergy, **5**: 253—269.

MALE, D., CHAMPION, B., COOKE, A., 1987, *Advanced Immunology*. J. B. Lippincott Co., Philadelphia.

MALECH, L. H., GALLIN, J. I., 1987, *Neutrophils in human diseases*. The New Engl. J. Med., **317**: 687—694.

MANDEL, T. E., 1977, *The ultrastructure of mammalian lymphocytes and their progeny*. În: *The lymphocytes structure and function* (Marchalonis, J. J., ed.), Marcel, Dekker, New York, p. 11—42.

MARCHALONIS, J. J., 1971, *Immunoglobulins and antibody-production in amphibians*. Amer. Zoologist, **11**: 171—181.

MARCHALONIS, J. J., WARR, G. W., RUBEN, L. N., 1978, *Evolutionary immunobiology and the problem of the T-cell receptor*. Developmental and comparative immunology, Pergamon Press, Inc. New York, **2**: 203—218.

MARRACK, J. R., 1963, *Sensitivity and specificity of methods of detecting antibodies*. Brit. Med. Bull., **19**: 178—182.

MARRACK, P., KAPPLER, J., 1986, *The T cell and its receptor*. Sci. Amer., **254**: 28—37.

MARRACK, P., BORN, W., ROEHM, N., FARR, A., KAPPLER, J., 1986, *T cell receptors in the thymus*. În: *Genes and proteins in immunity* (Kay, J., Kerr, M. A., Williams, A. F., Reid, K. B. M., eds.), The biochemical Society, Londra, p. 197—205.

MARRACK, P., KAPPLER, J., 1987, *The T cell receptor*. Science (S.U.A.), **238**: 1073—1079.

MARX, J. L., 1984, *Do antibodies prefer moving targets*, Science, **4676**: 819—821.

MARX, J. L., 1985, *The immune system „belongs in the body"*. Science (S.U.A.), **227**: 1190—92.

MARX, J. L., 1985, *Making antibodies without the antigen*, Science (S.U.A.), **228**: 162—165.

MATTHEWS, T. J., LYERLY, H. K., WEINHOLD, K. J., LANGLOIS, A. J., RUSCHE, J., PUTNEY, S. D., GALLO, R. C., BOLOGNESI, D. P., 1988, *Prospects for development of a vaccine against HIV*. În: *Human Retroviruses, Cancer and AIDS: Approaches to prevention and therapy*. Allan Liss Inc., New York, p. 313—325.

MAX, E. E., 1984, *Immunoglobulins: molecular genetics*. În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 167—204.

MAYER, M. M., 1975, *Le complément*. Das medizinische Prisma, 5 (75): 5—30.

McCARTY, M., 1985, *Antibodies in bacterial and fungal infections*. În: *Antibodies: protective, destructive and regulatory role* (Milgrom, Abeyounis, Albini, eds.), S. Karger, Basel, p. 74—81.

McCULLLOUGH, K. C., 1986, *Monoclonal antibodies: implications for virology*. Arch. Virol., **87**: 1—36.

McDEVITT, H. D., 1984, *Speculations on how Ia antigens (Ir genes) influence the specificity of the immune response*. Ann. Immunol. Inst. Pasteur, **135 D**: 227—236.

McNABB, P. C., TOMASI, T. B., 1981, *Host defense mechanisms at mucosal surface*. Ann. Rev. Microbiol., **138**: 976—983.

MELCHERS, F., RAJEWSKY, K., 1976, *The immune system*. 27 Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

MELCHERS, F., 1980, *Interactions of bacteria with the immune system*. În: *The molecular basis of microbial pathogenicity*. Dahlem Workshop Reports (Smith, H., Skehel, J. J., Turner, M. J., eds.), Verlag Chemie GmbH, Weinheim, p. 285—306.

MELCHERS, F., ANDERSON, J., 1986, *Factors controlling the B-cell cycle*. Ann. Rev. Immunol., **4**: 13—36.

MESROBEANU, I., BERCEANU, ŞT. (sub red.), 1975, *Immunologie, Imunochimie, Imunopatologie*, Edit. Academiei, Bucureşti.

MESTECKY, J., McGHEE, J. R., MICHALEK, S. M., ARNOLD, R. R., CRAGO, S. S., BABB, J. L., 1978, *Concept of the local and common mucosal immune response*. Adv. Exp. Med. Biol., **107**: 185—192.

MESTECKY, J., McGHEE, J. R., CRAGO, S. S., JACKSON, S., KILIAN, M., KIYONO, H., BABB, J. L., MICHALEK, S. M., 1980, *Molecular-cellular interactions in the secretory IgA Response*. J. Reticuloend. Soc., 28: 45s—60s.

MESTECKY, J., RUSSEL, M. W., 1986, *IgA subclasses*. Monogr. Allergy, 19: 277—301.

MESTECKY, J., RUSSEL, M. W., JACKSON, S., BROWN, T. A., 1986, *The human IgA system: a reassessement*. Clin. Immunol. Immunopathol., 40: 105—116.

MESTECKY, J., 1987, *The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions*. J. Clin. Immunol., 7: 265—276.

METCALF, D., 1985, *The Granulocyte-macrophage colony-stimulating factors*, Science (S.U.A.), 229: 16—22.

MEYER, T. F., MLAWER, N., SO, M., 1982, *Pilus expression in Neisseria gonorrhoeae involves chromosomal rearrangement*. Cell, 30: 45—52.

MILLER, J. F. A. P., 1975, *Significance of cellular interactions in the immune response*. The J. Allergy and Clin. Immunol., 55: 1—9.

MILLER, R. G., BENVENISTE, P., REIMANN, J., MURAKOA, S., 1986, *Role of self-reactivity in the generation of the T cell specificity repertoire*. Progress in Immunology, VI: 77—84. Academic Press, New York.

MILSTEIN, C., 1980, *Monoclonal Antibodies*, Sci. Amer., 243: 56—64.

MILSTEIN, C., EVEN, J., BEREK, C., 1986, *Molecular events during the onset and maturation of the antibody response*: În: *Genes and proteins in immunity* (Kay, J., Kerr. M. A., Williams, A. F., Reid, K.B.M., eds.), The Biochemical Society, Londra, p. 173—183.

MOGENSEN, S. C., 1979, *Role of macrophages in natural resistance to virus infections*. Microbiol. Rev., 43: 1—26.

MÖLLER, G., 1988, *Do suppressor T cells exist?* Preprint Department of Immunology University of Stockholm.

MORARU, I., PĂUNESCU, E. (sub. red.), 1981, *Dicționar enciclopedic de imunologie*. Edit. științifică și enciclopedică, București.

MORARU, I., 1984, *Imunologie (Bazele imunologice ale stării de sănătate și boală)*. Edit. Medicală, București.

MOREIN, B., SIMONS, K., 1985, *Subunit vaccines against enveloped viruses: virosomes, micelles and other protein complexes*. Vaccine, 3: 83—93. Butterworth Co. Publ. Ltd., Londra.

MOREIN, B., LÖVGREN, K., HÖGLUND, S., SUNDQUIST, B., 1987, *The ISCOM: an immunostimulating complex*. Immunol. Today, 8: 333—338.

MOREIN, B., 1988, *The ISCOM antigen-presenting system*, Nature (Londra), 332: 287—288.

MOSTOV, K. E., KRAEHENBUHL, J., BLOBEL, G., 1980, *Receptor-mediated transcellular transport of immunoglobulin: synthesis of secretory component as multiple and large transmembrane forms*. Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., 77: 7257—7261.

MOSTOV, K. E., FRIEDLANDER, M., BLOBEL, G., 1986, *Structure and function of the receptor for polymeric immunglobulins*. În: *Genes and proteins in immunity* (Kay, J., Kerr, M. A., Williams, A. F., Reid, K. B. M., eds.), The biochemical society, Londra, p. 113—117.

MOTAȘ, C., 1980, *Funcția părții glucidice a imunoglobulinelor*. St. cerc. biochim., 23: 87—102.

MOTICKA, E. J., 1975, *Development of immunological competence in chickens*. Amer. Zool., 15: 135—146.

MOULIN, A. — M., 1987, *L'idée de système immunitaire*. Arch. Inter. Physiol. & Biochimie. 1—7.

MOZES, E., SHEARER, G. M., 1972, *Genetic control of immune responses*. În: Current Topics in Microbiology and Immunology, 59: 167—200, Springer-Verlag, Berlin.

MULLBACHER, A., ADA, G. L., 1987, *How do cytotoxic T lymphocytes work in vivo*. Microbiol. Pathogenesis, 3: 315—319.

NAJJAR, V. A., 1974, *The physiological role of γ-globulin*. În: Adv. Enzymol. (Meister, A., ed.), John Wiley & Sons Inc., New York, p. 130—178.

NASH, A.A., 1985, *Tolerance and suppression in virus diseases*. Brit. Med. Bull., 41: 41—45.

NATHAN, C. F., MURRAY, H. W., COHN, Z. A., 1980, *The macrophage as an effector cell*, N. Engl. J. Med., 303: 622—626.

NELSON, D. S., 1974, *Immunity to infection, allograft immunity and tumor immunity: Parallels* and *contrasts*. Transpl. Rev., 19: 226—254.

NEVEU, P. J., 1986, *The mononuclear phagocyte system*. Bull. Inst. Pasteur, 84: 23—66.

NORTH, R. J., 1978, *The concept of the activated macrophages*. J. Immunol., 121: 806—809.

NOTKINS, A. L., KOPROWSKI, H., 1973, *How the immune response to a virus can cause disease*. Sci. Amer., **228**: 23–31.

NOSSAL, G. J. V., 1974, *Various forms of specialization in cells which synthetize immunoglobulins*. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), **125** C: 239–251.

NOSSAL, G. J. V., PIKE, B. L., 1975, *Evidence for the clonal abortion theory of B lymphocyte tolerance induction*. J. Exp. Med., **141**: 904 – 917.

NOSSAL, G. J. V., 1983, *Cellular mechanisms of immunologic tolerance*. Ann. Rev. Immunol., **1**: 33–62.

NOSSAL, G. J. V., 1987, *The basic components of the immune system*. The New Engl. J. Med., **316**: 1320–1325.

OHNO, S., MATSUNAGA, T., EPPLEN, J. T., HOZUMI, I., 1980, *Interaction of viruses and lymphocytes in evolution, differentiation and oncogenesis*. În : *Progress in Immunology*, IV, vol. 2 (Fougereau, M., Dausset, J., eds.), Academic Press, New York, p. 577–599.

OETTGEN, H. C., TERHORST, C., 1987, *A review of the structure and function of the T-cell receptor-T3 complex*. CRC Crit. Rev. Immunol., 131–147.

OLDSTONE, M. B. A., SISSONS, J. G. P., FUGINAMI, R. S., 1980, *Action of antibody and complement in regulating virus infection*. În : *Progress in Immunology*, IV, vol. 2 (Fougereau, M., Dausset, J., eds.), Academic Press, New York, p. 599–622.

OPFERKUCH, W., 1974, *Humorale mechanismen der Körpereigenen Infektabwehr*. Zbl. Bakt. Hyg., I, Abt. Orig. A, **227**: 159–166.

OSMOND, D. G., 1986, *B Lymphocyte genesis in the bone marrow*. În : Progress in Immunology, VI, Academic Press, New York, p. 49–58.

OUAISSI, M. A., CAPRON, A., 1985, *Fibronectines : structures et fonctions*. Ann. Immunol., Inst. Pasteur, **136** C: 169–185.

OUDIN, J., MICHEL, M., 1963, *Une nouvelle forme d'allotypie des golbulines γ du sérum de lapin apparement liée à la fonction et à la spécificité des anticorps*. C. R. Acad. Sci. (Paris), **257**: 805–808.

OUDIN, J., 1966, *The genetic control of immunoglobulin synthesis*. Proc. Roy. Soc B., **166**: 207–219.

OWEN, R. D., 1945, *Immunogenetic consequences of vascular anastomosis between bovine twins*. Science (S.U.A.), **102**: 400–402.

OWEN, J. J. T., 1977, *Ontogenesis of lymphocytes*. În : *The lymphocyte : Structural function* (Marchalonis, J. J., ed.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 21–34.

PAIGE, C. J., WU, G. E., SAUTER, H., 1986, *Molecular and cellular characteristics of clonable pre-B cells*. Progress in Immunol., VI, Academic Press Inc., New York, p. 42–48.

PARISH, W. E., 1972, *Host damage resulting from hypersensitivity to bacteria*. Symp. Soc. Gen. Microbiol., XXII, „Microbial Pathogenicity in man and animals". Cambridge Univ. Press, p. 157–192.

PARKER, C. W., 1984, *Mediators : Release and function*. În : *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 197–750.

PARKMAN, R., 1985, *T lymphocyte defects*. Clin. Immun. & Allergy, **5**: 325–339.

PARNHAM, M. J., de BRITO, F., 1987, *Modern aspects of inflammation*. Agents and actions, **22**: 248–251.

PAUL, W. E., 1984, *Immune response genes*. În : *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 439–456.

PAUL, W. E., 1984, *The immune system*. În : *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 3–22.

PAUL, W. E., 1985, *Living with lymphocytes*. Int. Archs. Allergy appl. Immunol., **77**: 7–12.

PAULING, L., 1940, *A theory of the structure and process of formation of antibodies*. J. Amer. Chem. Soc., **62**: 2643–2657.

PEARLSTEIN, E., GOLD, L. I., GARCIA–PARDO, A., 1980, *Fibronectin : a review of its structure and biological activity*. Mol. cell. Biochem., **29**: 103–128.

PELTIER, A. P., 1974, *L'opsonization*. Nouvelle Rev. Française d'Hématologie, **14**: 247–257.

PESTKA, S., BARON, S., 1981, *Definition and classification of the interferons*. Meth. Enzym., **78**: 3–14.

PIERCE, S. K., MARGOLIASH, E., 1988, *Antigen processing : an interim report*, TIBS, **13**: 27–29.

PILLOT, J., 1974, *Rélations entre la structure des anticorps et leurs propriétés effectrices inhérentes à la formation de l'immunocomplexe*. Bull. Inst. Pasteur, **72**: 375–341

PINCHING, A. J., 1984, *The acquired immune deficiency syndrome*. Clin. & Experim. Immunol., **56**: 1–13.

PITT, J., 1977, *Biology of the monocyte and macrophage. A review.* În : *Malnutrition and the immune response* (Suskind, R. M., ed.), Raven Press, New York, p. 225—231.

POLJAK, R. J., 1987, *Hypothesis : a molecular model for the MHC-restricted recognition of antigens by the T-cell receptor*, Ann. Inst. Pasteur, Immunol., 138 : 175—180.

POZSGI, N., GHYKA, Gr., 1974, *Imunogenetica.* Edit. Academiei, București.

PRENDERGAST, R. A., HENNEY, C. S., 1977, *Cellular Immune reactions.* În : *The lymphocyte structure and function* (Marchalonis, J. J., ed.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 257—277.

PRICE, P. J., 1984, *Hybridoma technology.* La Ricerca Clin. Lab., 14 : 277—285.

PUTNAM, F. W., TAKAHASHI, N., ISHIOKA, N., 1985, *Immunoglobulins. Structure and function.* In : *Antibodies : Protective destructive and regulatory role.* (Milgrom, Abeyounis, Albini eds.), Karger, Basel, p. 26—36.

RUSSEL, M. W., BROWN, T. A., MESTECKY, J., 1982, *Preferential transport of IgA and IgA-immune complexes into bile compared with other external secretions.* Molec. Immunol., 19 : 677—682.

RAFF, M. C., 1976, *Cell-surface immunology.* Sci. Amer., 234 : 30—39.

RAJEWSKY, K., FÖRSTER, I., CUMANO, A., 1987, *Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse.* Science (S.U.A.), 238 : 1088—1094.

RAULET, D. H., GARMAN, D. G., SAITO, H., TONEGAWA, S., 1985, *Developmental regulation of T-cell receptor gene expression.* Nature (Londra), 314 : 102—107.

RAVETCH, J. V., SIEBENLIST, U., KORSMEYER, S., WALDMANN, T., LEDER, P., 1981, *Structure of the human immunoglobulin locus. Characterization of embryonic and rearranged J and D genes*, Cell, 27 : 583—591.

RAYFIELD, L. S., 1985, *T cell receptors and immunoregulation*, J. Roy. Soc. Med., 78 : 1056—1062.

REAGAN, K. J., 1985, *Modulation of immunity to rabies virus induced by anti-idiotypic antibodies.* În : *Images of biological active structure in the immune system* (Koprowski, H., Melchers, F., eds.), Current Topics in Immunology, 119 : 15—30.

REINHERZ, E. L., SCHLOSSMAN, S. F., 1980, *Differentiation and function of human T lymphocytes.* Cell, 19 : 821—827.

REYNAUD, C.—A., DAHAN, A., ANQUEZ, V., DIXON, V., GRIMAL, H., WEILL, J.—C., 1986, *Generation of diversity during B cell ontogeny in the chicken.* Progress. in Immunol., VI : 33—41.

REYNOLDS, C. W., ORTALDO, J.R., 1987, *Natural killer activity : the definition of a function rather than a cell type*, Immunol. Today, : 172—174.

RICHARDS, F. F., KONIGSBERG, W. H., ROSENSTEIN, R. W., VARGA, J. M., 1975, *On the specificity of antibodies.* Science (S.U.A.), 187 : 130—137.

RICHTER, P. B., 1980, *The network idea and the immune response.* În : *Theoretical Immunology*, (Bell, G. I., Perelson, A. S., Pibley, G. H. eds.), Marcel Dekker Inc., New York, p. 539—569.

ROELANTS, G. E., 1977, *The regulatory role of macrophages in immune recognition.* În : *The lymphocyte strcture and function* (Marchalonis, J. J., ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, p. 104—125.

ROITT, I. M., 1974, *Essential Immunology*, ed. a 2-a, Blackwell Scientific Publ., Oxford.

ROITT, I. M., BROSTOFF, J., MALE, D. K., 1985, *Immunologie fondamentale et appliquée* Med. Sci. Paris.

ROPARTZ, C., 1971, *L'allotypie des immunologlobulines humaines.* Bull. Inst. Pasteur, 69 : 107—152.

ROSE, N. R., 1981, *Autoimune diseases.* Sci. Amer., 244 : 70—81.

ROSEN, F. S., COOPER, M. D., WEDGWOOD, R. J. P., 1984, *The primary immunodeficiencies.* I. New Engl. J. Med., 311 : 235—242.

ROSEN, F. S., COOPER, M. D., WEDGWOOD, R. J. P., 1984, *The primary immunodeficiencies*, II. New Engl. J. Med., 311 : 300—310.

ROSEN, F. S., ALPER, C. A., 1985, *Genetic deficiencies of the complement system.* Clinics in immunology and Allergy, 5 : 3711—383.

ROUX, K. H., VOLPE, E. P., 1975, *Evidence for a major histocompatibility complex in the leopard frog.* Immunogenetics, 2 : 577—589.

ROWLANDS, D. T. Jr., DANIELE, R. P., 1975, *Surface receptors in the immune response.* New Engl. J. Med., 293 : 26—32.

ROWLANDS, D. J., 1986, *Vaccines, the synthetic antigen approach.* În : *Biotechnology : Potentials and limitations* (Silver S., ed.), Springer Verlag, New York, p. 139—154.

ROYER, H. D., REINHERZ, E. L., 1987, *T. Lymphocytes: Ontogeny, Function and relevance to clinical disorders*. N. Engl. J., 317: 1136–1143.
SACHS, D. H., 1984, *The major histocompatibility complex*. În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 303–346.
SACKS, D. L., 1985, *Molecular mimicry of parasite antigens using anti-idiotypic antibodies*. În: *Images of biological active structures in the immune system* (Koprowski, H., Melchers, F. eds.), Current Topics in Microbiol. Immunol., 119: 45–55.
SAKANO, H., KUROSAWA, Y. WEIGERT, M., TONEGAWA, S., 1981, *Identification and nucleotid sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy chain genes*, Nature (Londra), 290: 562–565.
SAKATO, N., EISEN, H. N., 1975, *Antibodies to idiotypes of isologous immunoglobulins*. J. Exp. Med., 141: 1411–1426.
SAMELSON, L. E., HARFORD, J. B., KLAUSNER, R. D., 1985, *Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex*. Cell, 43: 223–231.
SARAGEA, M., CHIMION, D., OBRAŞCU, C., PEREŢIANU, D., URSU, I. H., 1987, *Tratat de fiziopatologie*, vol. II, Edit. Academiei, Bucureşti.
SAVAGE, D. C., 1972, *Survival on mucosal epithelia, epithelial penetration and growth in tissue of pathogenic bacteria*. În: *Microbial Pathogenicity in Man and animals*. 22th Symposia of the Society of general Microbiology, Oxford Univ. Press, p. 25–57.
SĂVULESCU, T., 1936, *L'immunité aux maladies bactériennes des plantes*. Soulisse-Martin Niort.
SCHER, I., MAGE, M. G., 1984, *Cellular identification and separation* În: *Fundamental Immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 767–780.
SCHMALZL, F., BRAUNSTEINER, H., 1970, *The cytochemistry of monocytes and macrophyges*. Seria Haemat., III: 93–131.
SCHMID–SCHÖNBEIN, G. W., SKALAK, R., CHIE, N., 1985, *Leukocyte protopodia*. În: *Frontiers in Biochmechanics* (Schmid-Schönbein G. W., Woo S. L. Y., Zweifach B. W., eds.), Springer Verlag, New York, p. 33–47.
SCHÖNHERR, O. T., HOUWINK, E. H., 1984, *Antibody engineering, a strategy for the development of monoclonal antibodies*. Antonie van Leeuwenhoek, 50: 597–623.
SCOTT-RODKEY, L., 1980, *Autoregulation of immune responses via idiotype network interactions*. Microbiol. Rev., 44: 631–659.
SCHWARTZ, R. H., 1984, *The role of gene products of the major histocompatibility complex in T cell activation and cellular interactions*. În: *Fundamental Immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 379–438.
SCHWARTZ, R. H., 1985, *T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex*. Ann. Rev. Immunol., 3: 237–261.
SEIDMAN, J. G., LEDER, A., NAU M., NORMAN, B., LEDER, B., 1978, *Antibody diversity: The structure of cloned immunoglobulin genes suggests a mechanisms for generating new sequences*, Science (Londra), 202: 11–14
SEILER, F. R., GRONSKI, P., KURRLE, R., LÜBEN, G., HARTHUS, H. P., AX, W., BOSSLET, K., SCHWICK, H. G., 1985, *Monoclonal antibodies: their chemistry, functions and possible uses*, Angew. Chem. Int. Fd. Engl., 24: 139–160.
SELA, M., 1974, *Vaccins synthétiques: un rêve ou une réalité?* Bull. Inst. Pasteur, 72: 73–86.
SELIGMANN, M., CHESS, L., FAHEY, J. L., FAUCI, A. S., LACHMANN, P. J., L'AGESTEHR, J., NGU, J., PINCHING, A. J., ROSEN, F. S., SPIRA, T. J., WYBRAN, J., 1985, *Une reévaluation immunologique du SIDA*. J. Intern. Med., 10: 269–312.
SEHGAL, P. B., 1982, *How many human interferons are there?* Interferon, 4: 1–22.
SELSING, E., STORB, U., 1981, *Somatic mutation of immunoglobulin light-chain variable-region genes*, Cell, 25: 47–58.
SEVERINSON, E., NAITO, T., TOKUMUTO, H., FUKUSHIMA, D., HIRANO, A., HAMA, K., HONJO, T., 1987, *Interleukin-4 IgG1 induction factor: a multifunctional lymphokine acting also on T cells*. Europ. J. Immunol., 17: 67–72.
SEVERINSON, E., SIDERAS, P., BERGSTEDT–LINDQUIST, S., 1987, *IgG1 induction factor*. Intern. Rev. Immunol., 2: 143–156.
SHAKIB, F., STANWORTH, D. R., 1980, *Human IgG subclasses in health and disease a review*. La Ricerca Clin. Lab., 10: 463–479; 561–580.
SHARMA, S. D., 1986, *The Macrophages*. Clin. Immunol. and Allergy, 6: 1–28.

SHEVACH, E. M., 1984, *Macrophages and other accessory cells*. În : *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 71—108.
SHIMIZU, A., HONJO, T., 1984, *Immunoglobulin class switching*, Cell, 36 : 801—803.
SHORTMAN, K., SCOLLAY, R., WILSON, A., CHEN, W. F., EWING, T., 1986, *Mature and immature thymocytes*. Progress in Immunology, VI, Academic Press Inc., New York, p. 95—104.
SIDERAS, P., BERGSTEDT-LINDQUIST, S., ROBSON Mac DONALD, H., SEVERINSON, E., 1985, *Secretion of IgG1 induction factor by T cell clones and hybridomas*. Europ. J. Immunol., 15 : 586—593.
SIDERAS, P., BERGSTEDT-LINDQUIST, S., ȘEVERINSON, E., 1985, *Partial biochemical characterization of IgG1-inducing factor*. Europ. J. Immunol., 15 : 591—598.
SILVERSTEIN, S. C., STEINMAN, R. M., COHN, Z. A., 1977, *Endocytosis*, Ann. Rev. Biochem., 46 : 669—722.
SILVERSTEIN, A. M., 1979, *Cellular versus humoral immunity : Determinants and consequences of an epic 19th century battle*. Cellular Immunology, 48 : 208—221.
SILVERSTEIN, A. M., 1984, *The history of immunology* : În : *Fundamental Immunology*, (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 23—42.
SILVERSTEIN, A. M., 1985, *A history of theories of antibody formation*, Cellular Immunology, 91 : 263—283.
SINGER, A., MIZUOCHI, T., MUNITZ, T. I., GRESS, R. E., 1986, *Role of self antigens in the selection of the developing T cell repertoire*. Progress in Immunology, VI : 60 — 66, Acad. Press, New York.
SISKIND, G. W., 1984, *Immunologic tolerance*. În : *Fundamental Immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 537—558.
SMITH, K. A., 1984, *Lymphokine regulation of T cell and B cell function*. În : *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 559—576.
SNYDERMAN, R., GOETZL, E. J., 1981, *Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis*. Science (Londra), 213 : 830—839.
SOLARI, R., KRAEHENBUHL. J. P., 1985, *The bioysnthesis of secretory component and its role in the transepithelial transport of IgA dimer*. Immunol. Today, 6 : 17—20
SOLOMON, J. B., HORTON, J. D. (eds.), 1977, *Developmental immunobiology*. Proceed. Symp. Developm. Immunobiol., Aberdeen Scotland. Elsevier, North Holland Biomed. Press, Amsterdam.
SOUILLET, G., GERMAIN, D., CARRAZ, M., VEYSSERE, C., FROBERT, Y., 1974, *La bactéricidie des polynucléaires neutrophiles*. Nouv. Rev. Fr. d'Hémat., 14 : 257—273.
SPECTOR, W. G., 1970, *The macrophage in inflammation*. Seria Haemat., III : 132—144.
SPRENT, J., 1977, *Recirculating Lymphocytes*. În : *The Lymphocyte: Structural function* (Marchalonis, J. F., ed.), Marcel Dekker, New York, p. 43—112.
SPRINGER, T. A., ANDERSON, D. C., 1986, *Leukocyte complement receptors and adhesion proteins in the inflammatory response: insight from an experiment of nature*. În : *Genes and proteins in immunity* (Kay, J., Kerr, M. A., Williams, A. F., Reid, K. B. M., eds.), The biochemical Society, Londra, p. 47—59.
STANBERRY, L. R., 1986, *Herpes virus latency and recurrence*. Progr. Med. Virol., 33 : 61— 77.
STEWARD, M. W., HOWARD, C. R., 1987, *Synthetic peptides. A next generation of vaccines*. Immunology Today, 8 : 51—58.
STITES, D. P., STOBO, J. D., FUDENBERG, H. H., WELLS, J. V., 1984, *Basic and clinical Immunology*, ed. a 5-a, Lange Medical Publ., Los Altos, S.U.A.
STOSSEL, T. P., 1977, *Motile functions of phagocytic effector cells* În : *Development of host defenses* (Cooper, M. D., Dayton, D. H., eds.), Raven Press, New York, p. 187—200.
STRATHERN, J. N., SPATOLA, E., McGILL, C., HICKS, J. B., 1980, *Structure and organization of transposable mating type cassettes in Saccharomyces yeast*. Proc. Natl. Acad. Sci., S.U.A., 77 : 2839 — 2843.
STREILEIN, J. W., AHMAD, F., BLACK, S., BLOMBERG, B., VOELLMY, R. W., (eds.), 1985, *Advances in gene technology: Molecular biology of the immune system*. Cambridge Univ. Press.
STUTTMAN, O., 1985, *Ontogeny of T cells*. Clin. Immunol. Allergy, 5 : 191—232.
SULLIVAN, S. M., CONNOR, J., HUANG, L., 1986, *Immunoliposomes: preparation, properties and applications*. Med. Res. Rev., 6 : 171—195.
SVEUM, R. J., BROWN, E. J., 1985, *The role of complement in bacterial diseases*. EOS Rivista di immunologia ed immunofarmacologia, 5 : 137—143.
SZTEIN, M. B., GOLDSTEIN, A. L., 1986, *Thymic hormones. A clinical update*. Springer. Seminars in immunopathology, 9 : 1—18.

TAYLOR, P. W., 1983, *Bactericidal and the bacteriolytic activity of serum against Gram-negative bacteria*. Microbiol. Rev., **47**: 46—83.

TAYLOR, T. P., PAPADIMITRIOU, J., 1984, *The interferons*. În: *Molecular variants of proteins: Biosynthesis and clinical relevance* (Campbell, P. N., Phelps, C. F., eds.), The Biochemical Society, p. 109—123.

TEALE, J. M., KLINMAN, N. R., 1984, *Control of production of different classes of antibody*. În: *Fundamental immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p.519—536.

TEILLAUD, J.—I., DESAYMARD, C., GIUSTI, A. M., HASELTINE, B., POLLOCK, R. R., YELTON, D. E., ZACK, D. J., SCHARFF, M. D., 1983, *Monoclonal antibodies reveal structural basis of antibody diversity*, Science (Londra), **222**: 721—726.

THEOFILOPOULOS, A. N., DIXON, F. J., 1982, *Evaluations immunologiques en clinique*. Triangle Journal Sandoz des Sciences Médicales, **XXII**, 19—34.

TILLINGHAST, J. P., 1988, *Molecular biology of the T-cell receptor*. În: *Year in Immunology*, **3**: 40—53, S. Karger, Basel.

TOMASI, T. B., PLAUT, A. G., 1985, *Humoral aspects of mucosal immunity* (Gallin, J. I., Fauci, A. S., eds.), Advances Host defense Mechanisms, **4**: 31—61. Raven Press New York.

TONEGAWA, S., 1983, *Somatic generation of antibody diversity*. Nature (Londra), **302**: 575 — 381.

TONEGAWA, S., 1985, *The molecules of the immune system*. Sci. Amer., **253**: 104—113.

TRAININ, N., SMALL, M., KOOK, A. I., 1977, *The role of thymic hormones in regulation of the lymphoid system*. În: *The Lymphocyte: Structural function* (Marchalonis, J. J., ed.), Marcel Dekker, New York, p. 84—102.

TROWBRIDGE, I. S., SHACKELFORD, D. A., 1986, *Structure and function of transferrin receptors and their relationship to cell growth*. În: *Genes and proteins in immunity* (Kay, J., Kerr, M. A., Williams A. F., Reid, K. B. M., eds.), The biochemical Society, Londra, p. 117—131.

TURK. J. L., 1975, *Immunologie médicale*, ed. a 2-a, Masson & C[ie], Paris.

TURNER, R. J., MANNING, M. J., 1974, *Thymic dependence of amphibian antibody responses*. Eur. J. Immunol., **4**: 343—346.

TURNER, M. J., 1984, *The biochemistry of variant surface glycoproteins of the african trypanosomes*. În: *Molecular variants of proteins: Biosynthesis and clinical relevance* (Campbell, P. N., Phelps, C. F.), The Biochemical Society, Londra, p. 169 — 183.

TADA, T., 1984, *Help, suppression and specific factors*. În: *Fundamental Immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 481—518.

TALMAGE, D. W., 1979, *Recognition and memory in the cells of the immune system*. Amer. Sci., **67**: 173—177.

TALMAGE, D. W., 1985, *Antibody formation: Cell selection revisited*. În: *Antibodies: protective, destructive and regulatory role* (Milgrom, Abeyounis, Albini, eds.), S. Karger, Basel, p. 14 — 25.

TAUBER, A. I., 1981, *Current views of neutrophil dysfunction*. Amer. J. Med., **70**: 1237 — 1246.

TAUSSIG, M. J., 1973, *Antigenic competition*, Curr. Top. Microbiol. Immunol., **60**: 125 — 174.

UHLENBRUCK, G., 1971, *Imunobiologie. Eine Einführung*. W. Goldmann Verlag, München.

UHR, J. W., CAPRA, J. D., VITTETA, E. S., COOK, R. G., 1979, *Organization of the immune response genes*. Science (S.U.A.), **206**: 292—297.

UNANUE, E. R., ASKONAS, B., 1968, *Persistance of immunogenicity of antigen after uptake by macrophages*. J. Exp. Med., **127**: 915—925.

UNANUE, E. R., BELLER, D. I., CALDERON, J., KLEY, J. M., STADECKER, M. J., 1976, *Regulation of immunity and inflammation by mediators from macrophages*. Amer. J. Path., **85**: 465—478.

UNANUE, E. R. (ed.), 1977, *General Pathology — Immunology*. Harvard Medical School, Boston.

UNANUE, E. R., 1984, *Antigen-presenting function of the macrophage*. Ann. Rev. Immunol., **2**: 395—428.

UNANUE, E. R., BELLER, D. I., LU, C. Y., ALLEN, P. M., 1984, *Antigen-presentation: comments on its regulation and mechanism*. J. Immunol., **132**: 1—5.

UNANUE, E. R., ALLEN, P. M., 1987, *The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells*. Science (S.U.A.), **236**: 551—557.

URBAIN, J., CAZENAVE, P. A., WIKLER, M., FRANSSEN, J. D., MARIAME, B., LEO, O., 1981, *Idiotypic induction and immune networks*. În: *Immunology '80: Progress in Immunology. IV* (Fougereau, M., Dausset, J., eds.), Academic Press, Londra, p. 81—93.

URBAIN, J., BRAIT, M., BRUYNS, C., DEMEUR, C., DUBOIS, P., FRANCOTTE, M. FRANSSEN, J. D., HIERNAUX, H., LEO, O., MARVEL, J., MEYERS, P., MOSER, M., SLAOUI, M., TASSIGNON, J., URBAIN-VANSANTEN, G., VAN ACKER, A., WIKLER, F., WUILMART, C., 1985, *Order from the beginning or order out of chaos?* În : *Images of biological active structure in the immune system* (Koprowski H., Melchers F., eds.), Current Topics Microbiol., Immunol., 119 : 127–142.

UYTDEHAAG, F. G. C. M., OSTERHAUS, A. D. M. E., 1985, *Vaccines from monoclonal anti-idiotypic antibody: poliovirus infection as a model.* În : *Images of biological active structures in the immune system* (Koprowski H., Melchers F., eds.), Current Topics Microbiol. Immunol., 119 : 31–43.

UYTDEHAAG, F., G. C. M., BUNSCHOTEN, H., WEIJER, K., OSTERHAUS, A. D. M. E., 1986, *From Jenner to Jerne: towards idiotype vaccines,* Immunol. Rev., 90 : 93–113.

VALCURONE, G., TASSI, G. C., 1985, *Immunomodulators and allergy.* Boll. Ist. Sieroterap., Milan, 64 : 175–194.

VAN EDEN, W., HOLOSHITZ, J., COHEN, I. R., 1986, *Autoimmunity and the host-parasite relationship.* Clin. Immunol. and Allergy, 6 : 113–126.

VAN FURTH, R. COHN, Z. A., HIRSCH, J. G., HUMPHREY, J. H., SPECTOR, W. G., 1972, *Le système phagocitaire mononucléaire: nouvelle classification des macrophages, des monocytes et de leurs souches.* Bull. Org. Mond. Santé, 47 : 651–658.

VAN FURTH, R., 1982, *Current view on the mononuclear phagocyte systeme.* Immunobiol., 161 : 178–185.

VELDKAMP, J., VAN DER GAAG, R., WILLIERS, J. M. N., 1973, *The role of Peyer's patch cells in antibody formation.* Immunology, 25 : 761–771.

VERETENNIKOVA, N. I., CHIPE, N. S. G. I., NIKIFOROVICH, G. Y., BETINSCH, Y. A.R., 1981, *Rigin, another phagocytosis — stimulating tetrapeptide isolated from human IgG.* Int. J. Peptide Protein Res., 17, 430–435.

VERNON-ROBERTS, B., 1972, *The Macrophage.* Cambridge Univ. Press.

VITETTA, E. S., BROOKS, K., ISAKSON, P., LAYTON, J., PURÉ, E., YUAN, D., 1984, *T lymphocyte receptors.* În : *Fundamental Immunology* (Paul, W. E., ed.), Raven Press, New York, p. 245–266.

VOGLER, L. B., 1985, *Ontogeny of B cells and humoral immune functions.* Clin. Immun. & Allergy, 5 : 235–253.

VOLKMAN, A., 1970, *The origin and fate of the monocyte.* Seria Haemat., III : 62–92.

VON BOEHMER, H., 1986, *Ontogeny of T cell receptors for Antigen.* În : *Progress in Immunology,* VI : 85–94, Academic Press, New York.

WAKELIN, D., 1984, *Immunity to parasites. How Animals Control Parasite Infections.* Edw. Arnold, Baltimore, S.U.A.

WAHL, S. M., WILTON, J. M., ROSENSTREICH, D. L., OPPENHEIM, J. J., 1975, *The role of macrophages in the production of lymphokines by T and B lymphocytes.* J. Immunol., 114 : 1296–1301.

WALDMANN, T. A., 1986, *The structure, function and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes.* Science (S.U.A.), 232 : 727–732.

WALKER, P. D., 1987, *Current trends and advances in bacterial vaccines today.* J. Appl. Bacteriol., 62 : 1–23.

WANG, AN-CHUAN, FUDENBERG, H. H., 1974, *IgA and evolution of immunoglobulins.* J. Immunogenetics, 1 : 3–31.

WARD, P. A., LEPOW, I. H., NEWMAN, L. J., 1968, *Bacterial factors chemotactic for polymorphonuclear leucocytes.* Amer. J. Pathol., 52 : 125–736.

WARNER, N. L., SZENBERG, A., 1964, *The immunological function of the bursa of Fabricius in the chicken.* Ann. Rev. Microbiol., 18 : 253–268.

WATSON, D. L., 1980, *Immunological functions of the mammary gland and its secretion.* Comparative review. Austr. J. Biol. Sci., 33 : 403–422.

WEDGWOOD, R. J., 1985, *B cell defects.* Clin. Immun. & Allergy, 5 : 301–325.

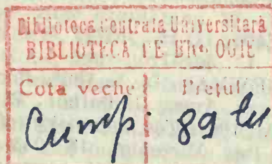
WEIGERT, M., GATMAITAN, L., LOH, E., SCHILLING, J., HOOD, L. E., 1978, *Rearrangement of genetic information way produce immunoglobulin diversity.* Nature, 276 : 785–790.

WEILL, J.-C., REYNAUD, C.-A., 1987, *The chicken B cell compartment.* Science (S.U.A.), 238 : 1094–1098.

WEIR, D. M., 1970, *Immunology for undergraduates.* E. & S. Livingstone, Edinburgh.

WEISSMANN, G., DUKOR, P., 1970, *The role of lysosomes in immune responses.* Adv. Immunol., 12 : 283–331.

WELLS, J. V., NELSON, D. S. (eds.), 1986, *Clinical Immunology illustrated.* Williams & Wilkins Adis. PT Ltd., Baltimore, S.U.A.
WERDELIN, O., 1987, *T cells recognize antigen alone and not MHC molecules.* Immunol. Today, 8: 80–84.
WEST, B. C., ROSENTHAL, A. S., GELB, N. A., KIMBALL, H. R., 1974, *Separation and characterization of human neutrophil granules.* Amer. J. Pathol., 77: 41–61.
WESTHOF, E., ALTSCHUH, D., MORAS, D., BLOOMER, A. C., MONDRAGON, A., KLUG, A., VAN REGEN MORTEL, M. H. V., 1984, *Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins.* Nature (Londra), 311: 123–126.
WHITE, R. G., 1976, *The adjuvant effect of microbial products on the immune response.* Ann. Rev. Microbiol., 30: 579–600.
WIGZELL, H., BINZ, H., 1980, *Lymphocyte receptors.* În: *Progress in Immunology. IV* (Fougerau, M., Dausset, J., eds.), Acad. Press, New York, p. 94–112.
WILLIAMS, R. C., GIBBONS, R. J., 1972, *Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal.* Science (S.U.A.), 77: 697–699.
WILLIAMSON, A. R., 1972, *Clones of antibody-forming cells: natural and experimental selection.* Endeavour, 31: 118–122.
WILSON, M., 1985, *Immunology of the fetus and newborn: lymphocyte phenotype and function.* Clin. Immunol. & Allergy, 5: 271–287.
WOO, P.T.K., 1987, *Immune response of fish to parasitic protozoa.* Parasitol. Today, 3: 186–188.
WOOD, R. K. S., 1972, *Disease resistance in plants.* Proc. R. Soc. London, B, 181: 213–232.
WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1973, *Immunité cellulaire et résistance à l'infection.* W.H.O. Série des rapports techniques Genève.
YELTON, D. E., SCHARFF, M. D., 1980, *Monoclonal antibodies.* Amer. Sci., 68: 510–516.
YOUNG, C. R., 1984, *Towards new vaccines.* J. Roy. Soc. Med., 77: 261–263.
YOUNG, M. C., GEHA, R. S., 1985, *Ontogeny and control of human IgE synthesis.* Clinics in Immunol. & Allergy, 5: 351–371.
YEWDELL, J. W., GERHARD, W., 1981, *Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies.* Ann. Rev. Microbiol., 35: 657 – 680.
ZARNEA, G., 1983, Tratat de microbiologie generală, vol. I, Edit. Academiei, București.
ZARNEA, G., 1984, Tratat de microbiologie generală, vol. II, Edit. Academiei, București.
ZARNEA, G., 1986, Tratat de microbiologie generală, vol. III, Edit. Academiei, București.
ZINKERNAGEL, R. M., 1979, *Associations between major histocompatibility antigens and susceptibility to disease.* Ann. Rev. Microbiol., 33: 201–213.
ZHOU, E.-M., DREESMAN, G. R., KENNEDY, R. C., 1987, *Anti-idiotypic antibodies: a new generation of vaccines against infections agents.* Microbiol. Sci., 4: 36 – 40.
ZOLA, H., 1985, *Differentiation and maturation of human B lymphocytes: a review.* Pathology, 17: 365–381.
ZWEIFACH, B. W., GRANT, L., McCLUSKEY, R. T., 1965, *The inflammatory process.* Academic Press, New York, Londra.
ZWISSLER, O., 1985, *New trends in the development of vaccines.* Zbl. Bakt. I, Abt. Orig., 180: 165–174.



Redactor: ECATERINA GHICA
Tehnoredactor: MAGDALENA IACOB

Bun de tipar: 1990. Format: 16/70×100.
Coli de tipar: 50,50. Planșe: 40.
C. Z. pentru biblioteci mari: 576,8 (021) = 59.
C. Z. pentru biblioteci mici: 57.

UNIVERSUL c. 110

Lei 89

ISBN 973-27-0081-5
ISBN 979-27-0080-7